



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**SROVNÁNÍ RŮSTU A PRODUKTIVITY AUTOTROFNÍCH
ŘAS A KAROTENOGENNÍCH KVASINEK**

COMPARISON OF GROWTH AND PRODUCTIVITY OF AUTOTROPHIC ALGAE AND RED YEASTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Xenie Kouřilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1105/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Xenie Kouřilová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Srovnání růstu a produktivity autotrofních řas a karotenogenních kvasinek

Zadání bakalářské práce:

V rámci bakalářské práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Kultivace vybraných druhů řas a kvasinek včetně testování možností kokultivace
2. Analýza obsahu vybraných metabolitů – lipidů, pigmentů, sterolů a bílkovin
3. Srovnání produkce metabolitů řasami a kvasinkami za různých fyzikálních podmínek

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Xenie Kouřilová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená práce představuje srovnání růstu a produktivity karotenogenních kvasinek *Rhodotorula aurantiaca* a *Xanthophyllomyces dendrorhous* a autotrofních řas *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella vulgaris* za různých fyzikálních podmínek. Teoretická část obsahuje charakteristiku vybraných mikroorganismů, stresové podmínky způsobeny teplotou, zářením, kombinací vzdušnění a záření a také osmotickým stresem. Dále jsou zmíněny poznatky o metabolitech a možnostech jejich analýzy.

U vybraných kmenů byly při kultivaci aplikovány fyzikální stresy, konkrétně 2%, 3%, 3% a 5% roztok NaCl, intenzivní záření, absence osvětlení, 8 °C a 30 °C. V těchto podmínkách byly sledovány změny produkce karotenoidů, mastných kyselin, ergosterolu, ubichinonu a bílkovin.

Výrazné inhibiční účinky na všechny výše zmíněné mikroorganismy vykazovalo použití 5% roztoku NaCl. Nejvyšší produkce metabolitů u *X. dendrorhous* byla zjištěna při použití 4% roztoku NaCl. *R. aurantiaca* vykazovala vyšší výtěžnost látek při 30 °C. Pro zvolené kmeny řas byly použité stresy letální.

V rámci kultivací byly také testovány možnosti kokultivací kvasinek a řas, které budou předmětem dalších studií.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, autotrofní řasy, karotenoidy, lipidy, proteiny, HPLC/PDA, GC/FID

ABSTRACT

The submitted bachelor thesis focuses on the comparison of growth and productivity of red yeasts *Rhodotorula aurantiaca* and *Xanthophyllomyces dendrorhous* and autotrophic algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* under different physical conditions.

The theoretical part contains the characteristics of selected micro-organisms, stress factors caused by temperature, radiation, combination of aeration and radiation and osmotic stress. Furthermore, knowledge on metabolites and the possibilities of their analysis are mentioned.

Physical stresses, namely 2%, 3%, 4% and 5% solution of sodium chloride, intense radiation, absence of lighting, 8°C and 30°C, were applied to selected strains in cultivation. Under these conditions, changes in production of carotenoids, fatty acids, ergosterol, ubiquinone and proteins were being observed.

A significant inhibitive effect on all the above mentioned micro-organisms was brought about by the use of 5% solution NaCl. The highest production of metabolites with *X. dendrorhous* was discovered when 4% solution of NaCl was used. *R. aurantiaca* demonstrated higher substance utilization at 30°C. For the selected algae strains were the used stresses lethal.

Within the cultivation process, the possibilities of co-cultivation of yeasts and algae were also tested, which will be the subject of further studies.

KEY WORDS

Red yeast, autotrophic algae, carotenoids, lipids, proteins, HPLC/PDA, GC/FID

Bibliografická citace

KOUŘILOVÁ, X. *Srovnání růstu a produktivity autotrofních řas a karotenogenních kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 55 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a cenné podněty a připomínky. Chtěla bych také poděkovat konzultantce Ing. Daně Byrtusové za trpělivost nejen při konzultacích a ochotu řešit vše, co by mohlo být překážkou při tvorbě práce.

Velké poděkování patří především rodině a také přátelům za morální i materiální podporu.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Kvasinky	10
2.1.1	Karotenogenní kvasinky	10
2.1.1.1	Rod <i>Rhodotorula</i>	10
2.1.1.2	Rod <i>Xanthophyllomonas</i>	11
2.2	Řasy	12
2.2.1	Rod <i>Chlamydomonas</i>	12
2.2.2	Rod <i>Chlorella</i>	13
2.3	Karotenoidy	13
2.3.1	Struktura	14
2.3.2	Funkce	14
2.3.3	Biosyntéza karotenoidů	15
2.4	Lipidy	16
2.4.1	Funkce	16
2.4.2	Biosyntéza lipidů	16
2.4.2.1	Biosyntéza mastných kyselin	16
2.4.2.2	Biosyntéza triacylglycerolů	17
2.4.3	Izoprenoidy	17
2.4.3.1	Ergosterol	17
2.4.3.2	Ubichinon	17
2.5	Proteiny	18
2.5.1	Funkce	18
2.5.2	Struktura	18
2.6	Stresové podmínky	18
2.6.1	Teplota	18
2.6.2	Záření	19
2.6.3	Osmotický stres	19
2.7	Metody analýzy	19
2.7.1	GC/FID	19
2.7.2	HPLC/PDA	20
2.7.3	Stanovení celkových proteinů	20

2.7.3.1	Hartree-Lowryho metoda.....	20
2.7.4	Absorpční spektrofotometrie UV-VIS.....	20
3	Cíl práce	21
4	Experimentální část.....	22
4.1	Přístroje a pomůcky	22
4.1.1	Kultivace kvasinek	22
4.1.2	Kultivace řas	22
4.1.3	Izolace a analýza vybraných metabolitů.....	22
4.2	Použité chemikálie	22
4.2.1	Kultivace kvasinek a řas	22
4.2.2	Extrakce a transesterifikace	23
4.2.3	HPLC	23
4.2.4	Stanovení celkových proteinů	23
4.3	Použité kmeny mikroorganismů	23
4.3.1	Použité kmeny kvasinek	23
4.3.2	Použité kmeny řas.....	23
4.4	Kultivace mikroorganismů.....	23
4.4.1	Kultivace kvasinek	23
4.4.1.1	Inokulum I a II	24
4.4.1.2	Produkční médium	24
4.4.2	Kultivace řas	24
4.4.2.1	Kultivační médium.....	25
4.4.2.2	Multikultivátor MC-1000 OD, Photon Systems Instruments	25
4.4.3	Kokultivace.....	26
4.4.4	Růstové křivky.....	26
4.5	Metody stanovení biomasy a metabolitů	26
4.5.1	Extrakce	26
4.5.2	Transesterifikace.....	27
4.5.3	Stanovení karotenoidů, sterolů a chlorofylu	27
4.5.4	Stanovení lipidů.....	27
4.5.5	Stanovení proteinů.....	27
5	Výsledky a diskuze.....	29
5.1	Růstové křivky kvasinek.....	29

5.1.1	Růstová křivka <i>Xantophyllomyces dendrorhous</i>	29
5.1.2	Růstová křivka <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	30
5.2	Produkce vybraných metabolitů v průběhu růstu kvasinek	30
5.2.1	Produkční charakteristika <i>X. dendrorhous</i>	31
5.2.2	Produkční charakteristika <i>R. aurantiaca</i>	32
5.3	Růstové křivky řas	34
5.3.1	Růstová křivka <i>C. reinhardtii</i>	34
5.3.2	Růstová křivka <i>C. vulgaris</i>	34
5.4	Produkční charakteristika řasy <i>C. reinhardtii</i>	35
5.5	Produkční charakteristika řasy <i>C. vulgaris</i>	36
5.6	Produkce biomasy a metabolitů v přítomnosti stresových faktorů	38
5.6.1	Vliv stresů na produkci biomasy	38
5.6.2	Vliv stresů na produkci karotenoidů.....	40
5.6.3	Vliv stresů na produkci ergosterolu.....	42
5.6.4	Vliv stresů na produkci ubichinonu.....	44
5.6.5	Vliv stresů na produkci mastných kyselin.....	46
5.6.6	Vliv stresů na produkci celkových proteinů	48
5.7	Kokultivace	50
6	Závěr.....	51
7	Seznam použitých zdrojů	52
8	Seznam použitých zkratk.....	55

1 ÚVOD

Kvasinky mají v současné době naprosto nenahraditelnou pozici. Jsou nejvyužívanějším mikroorganismem především v potravinářském průmyslu, kde se s nimi setkáváme například při výrobě alkoholických nápojů, potravinářské a krmné biomasy apod. Neméně důležitou roli zastupují ve farmaceutickém průmyslu nebo také jako modelové organismy. Další velmi významnou funkci zastávají při produkci metabolitů, jako jsou karotenoidy, lipidy, proteiny a další.

V posledních desetiletích se velice rozvíjí využití mikrořas. V tomto ohledu mají velký potenciál. Komerčně se využívají jako doplňky stravy, zejména jako zdroj proteinů, vitamínů a minerálů (*Chlorella*, *Spirulina*), krmivo pro hospodářská zvířata, léčiva nebo také biopalivo. Další využití jsou stále předmětem výzkumu.

Karotenoidy patří do skupiny tetraterpenoidů, sestávajících z isoprenoidních jednotek. Převážně se vyskytují v rostlinách, ale je možné se s nimi setkat i u živočichů. Velice významná je jejich antioxidační schopnost. Jejich dlouhodobé užívání funguje jako prevence proti různým onemocněním. Dále slouží také k výrobě barviv, léčiv a výživových doplňků.

Lipidy jsou látky rostlinného i živočišného původu. Mají široké spektrum využití. Především poskytují energii, kterou také uchovávají pro pozdější využití. V podobě dvojvrstvy tvoří fosfolipidy základní stavební kámen biologických membrán.

Proteiny také označované jako bílkoviny se řadí mezi biopolymery. V organismu zastupují mnoho funkcí. Jsou základní stavební strukturou všech buněk. Tvoří obranu organismu. Podílejí se na regulačních mechanismech. Významnou úlohu plní také jako transportní látky (hemoglobin, transferin).

Bakalářská práce je zaměřena na srovnání růstu karotenogenních kvasinek a autotrofních řas. Dále se zabývá produkcí metabolitů, konkrétně karotenoidů, lipidů a proteinů při optimálních podmínkách kultivace a pod vlivem vybraných fyzikálních a chemických stresových faktorů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné heterotrofní eukaryotické mikroorganizmy náležící do říše Houby (*Fungi*). V přírodě jsou velmi rozšířené. Vyskytují se ve vodě, v půdě a také ve vzduchu. Doposud bylo popsáno přibližně 1500 druhů kvasinek náležících do více než 100 rodů. Morfologie kvasinek je rozmanitá. Mezi nejčastější tvary patří elipsoidní, kulovitý a cylindrický. Buněčná stěna kvasinek má silnou a pevnou strukturu. Dává buňce tvar a ochranu před mechanickými vlivy a osmotickým šokem. Hlavní podíl buněčné stěny tvoří polysacharidy. Dále obsahuje bílkoviny, lipidy, fosfolipidy a fosforečnany. Rozměr buněk se obvykle pohybuje v rozmezí 3-5 μm , v extrémních případech až 40 μm . Kvasinky žijí jednotlivě nebo v koloniích. Jejich rozmnožování se dělí na dva typy, a to vegetativně pučením či dělením nebo pohlavně tvorbou bazidiospor nebo askospor [1-5].

2.1.1 Karotenogenní kvasinky

Některé kvasinky mají schopnost tvořit karotenoidní pigmenty. Díky pigmentům získávají charakteristické červené, oranžové až žluté zbarvení. Vzhledem k těmto vlastnostem bývají často označovány také jako červené kvasinky. Karotenogenní kvasinky řadíme do třídy *Basidiomycetae*. Významnými rody této skupiny jsou *Rhodotorula*, *Phaffia*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* a *Rhodosporidium* [2, 5].

2.1.1.1 Rod *Rhodotorula*

Všechny druhy rodu *Rhodotorula* dokáží produkovat a akumulovat tuky, jsou lipidotvorné. Za specifických podmínek produkce probíhá ve zvýšeném množství. Tento rod je také charakteristický tvorbou karotenoidů, konkrétně β -karotenu, torularhodinu a torulenu. Patří sem například *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis* [6, 7].

V kapalném prostředí tvoří sediment a prstenec většinou světlé, krémové až světle růžové barvy. Nátěr na agaru může být barevně rozdílný. Výsledná barva závisí na složení živného média. Je hladký, lesklý, slizovitý (*Obr. 1*). Téměř netvoří pseudomycelium [2].

Rod *Rhodotorula* je rozšířen po celém světě. Nachází se ve vzduchu, půdě, sladké i slané vodě, na povrchu rostlin nebo v různých orgánech živočichů. Jejich nároky na životní podmínky nejsou vysoké, především na množství dusíku. Proto se často vyskytují v půdách s nízkým obsahem tohoto prvku [2].



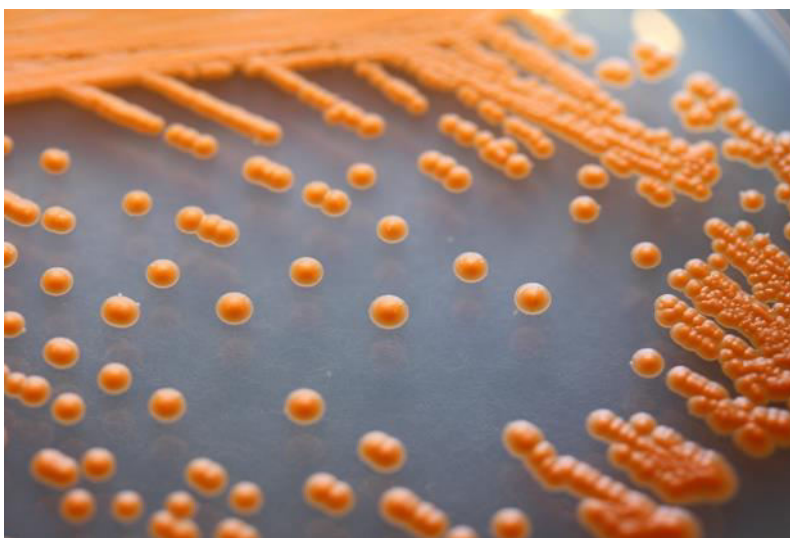
Obr. 1: *Rhodotorula aurantiaca* [9]

2.1.1.2 Rod *Xanthophyllomonas*

Kvasinky rodu *Xanthophyllomonas*, dříve označovány jako *Phaffia*, jsou typické pro produkci velkého množství karotenoidů, konkrétně astaxanthinu, v menší míře také β -karotenu. Divoké kmeny mají nižší výnosy astaxanthinu, proto jsou pro průmyslovou produkci modifikovány [2, 6, 8].

Xanthophyllomonas tvoří nejčastěji elipsoidní buňky. Žije jednotlivě, v párech nebo také v krátkých řetízcích (Obr. 2). Dělí se pučením. Kolonie jsou červené až lososové. Při kultivaci na agaru je nátěr pomerančovočervený hladký, občas mírně skládaný. V kapalném médiu se vytváří sediment i prstenec [2].

Od ostatních karotenogenních kvasinek se liší schopností zkvašovat sacharidy. Často pouze velmi slabě, při nízké teplotě a po delší době [2].



Obr. 2: *Xanthophyllomyces dendrorhous* [10]

2.2 Řasy

Řasy (*Algae*) jsou převážně fotoautotrofní organizmy. Náleží do čtyř říší – Bakterie, Chromista, Prvoci a Rostliny. Jejich systematické zařazení je v tab. 1 [10].

Tab. 1: Systematické zařazení řas [11]

Impérium	Říše	Oddělení
Prokaryota	Bakterie (<i>Bacteria</i>)	Sinice (<i>Cyanobakterie</i>)
Eukaryota	Rostliny (<i>Plantae</i>)	Glaucophyta Ruduchy (<i>Rhodophyta</i>) Zelené řasy (<i>Chlorophyta</i>) Parožnatky (<i>Charophyta</i>)
	Chromista	Heterokontophyta (<i>Chromophyta</i>) Skrytěnky (<i>Cryptophyta</i>) Ochrophyta Cercozoa
	Prvoci (<i>Protozoa</i>)	Chlorarachniophyta Krásnoočka (<i>Euglenozoa</i>) Obrněnky (<i>Dinophyta</i>)

Mezi řasami je možné nalézt jednobuněčné i mnohobuněčné organismy. Dále se vyskytují v koloniích nebo také jako složitější listnaté formy podobné cévnatým rostlinám. Vzhledem k funkci fotosyntézy obsahují mnoho fotosyntetických pigmentů. Nejdůležitějším je chlorofyl. Dalšími významnými barvivy jsou skupiny karotenoidů. U všech skupin řas je přítomen β -karoten. Řasy se nacházejí ve sladkovodním prostředí i slaných vodách s širokou tolerancí pro pH. Také je možné je najít v půdě. Využívají též symbiózy – vzájemně prospěšného soužití. Ve spojení s houbami tvoří lišejníky [11, 12].

2.2.1 Rod *Chlamydomonas*

Chlamydomonas je haploidní jednobuněčná eukaryotní řasa. Všechny druhy jsou schopné růst autotrofně. Žije ve sladkých stojatých nebo mírně tekoucích vodách, ale také ve vlhkých půdách a zasněžených krajinách. Některé druhy jsou schopné žít i v brakických a mořských vodách. Je popsáno přibližně 500 druhů. Každá buňka obsahuje chloroplast a má dva bičíky (viz Obr. 3). *Chlamydomonas* se běžně využívá ve výzkumu, většinou v molekulární genetice, protože je haploidní, má jednoduchý životní cyklus, snadno se kultivuje a rychle roste [13, 14].



Obr. 3: *Chlamydomonas* pod světleným mikroskopem [13]

2.2.2 Rod *Chlorella*

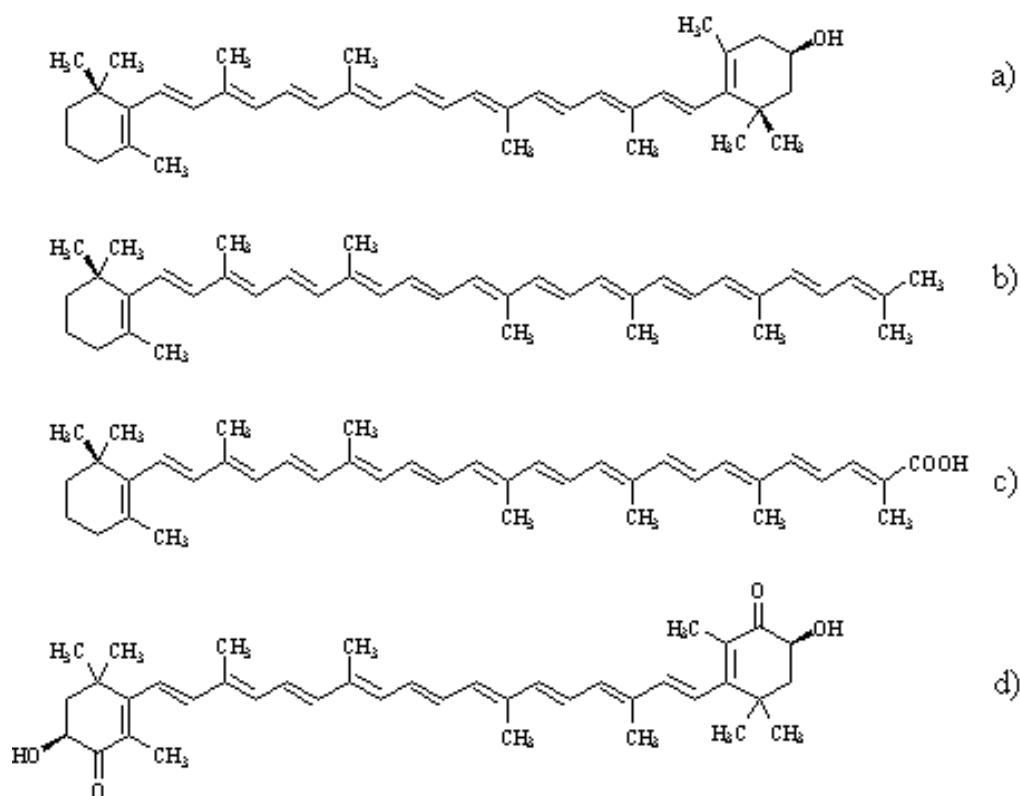
Chlorella je snadno kultivovatelná, rychle rostoucí jednobuněčná řasa, obvykle kulovitého (Obr. 4) až elipsoidního tvaru. Druhy *Chlorella* jsou schopny autotrofního růstu. Mohou růst také bez přístupu světla, ale pouze v případě zajištění jiného zdroje uhlíku v podobě glukózy, kterou jsou schopny utlilizovat. Buňky jsou bohaté na aminokyseliny, minerální látky a vitamíny. Z tohoto důvodu je hojně využívána jako potravinový doplněk. *Chlorella* se vyskytuje ve vlhkých půdách, na kůře stromů, také ve sladkovodním prostředí a kanalizaci. Některé druhy *Chlorella* žijí jako symbionti bezobratlých nebo hub [13].



Obr. 4: Buňky *Chlorella* pod světleným mikroskopem [13]

2.3 Karotenoidy

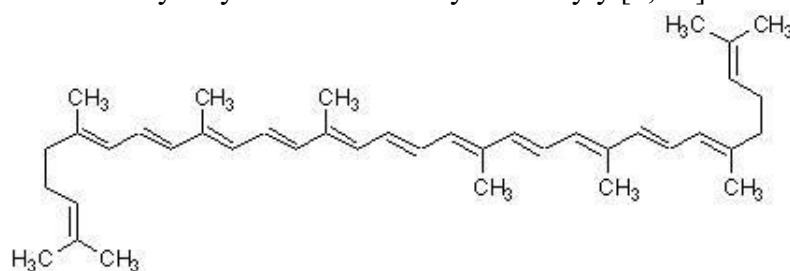
Karotenoidy jsou přirozeně se vyskytující pigmenty syntetizované rostlinami a mikroorganismy. Jedná se o produkty sekundárního metabolismu, vycházející z isoprenoidní dráhy. Jsou to nepolární látky. Kvasinky rodů *Rhodotorula* a *Xanthophyllomyces* mají schopnost přirozeně tyto pigmenty produkovat. *Rhodotorula* syntetizuje především β -karoten, torulen a torularhodin (Obr. 5), *Xanthophyllomyces* astaxanthin a v menší míře také β -karoten. U zelených řas se nachází zejména β -karoten, violaxanthin, neoxanthin a lutein. Ve stresových podmínkách rod *Chlorella* produkuje ketokarotenoidy, canthaxanthin a astaxanthin [7, 15, 16].



Obr. 5: a) β -karoten, b) torulen, c) torularhodin, d) astaxanthin

2.3.1 Struktura

Karotenoidy se řadí mezi terpenoidy, konkrétně do skupiny tetraterpenů tvořených osmi isoprenoidními jednotkami. Formálně by mohly být odvozeny od acyklického lykopenu (*Obr. 6*) s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Díky tomuto uspořádání jsou schopny absorbovat záření určitých vlnových délek. Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: uhlovodíky nazývané karoteny a kyslíkaté sloučeniny xanthofyly [7, 15].



Obr. 6: Lycopene

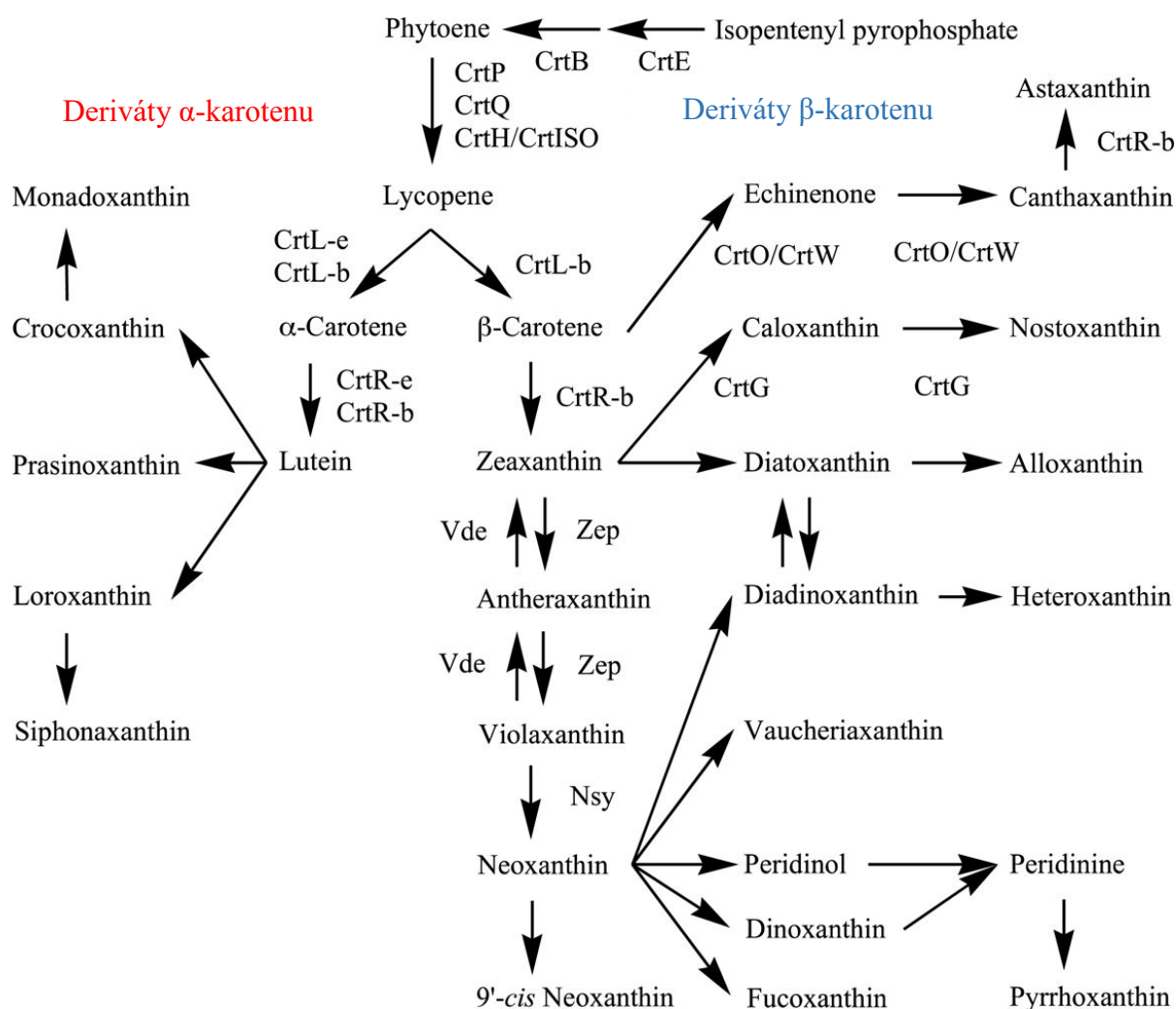
2.3.2 Funkce

Karotenoidy zastupují v metabolismech rostlin a živočichů mnoho různých funkcí. V první řadě slouží k ochraně buněk před ultrafialovou složkou slunečního záření. Také fungují jako doplňkové fotoaktivní pigmenty [5, 17].

Karotenoidy vykazují antioxidační účinky. U lidí jsou využívány k prevenci různých degenerativních či kardiovaskulárních onemocnění. Těž plní funkci prekurzorů vitamínu A. V kosmetickém průmyslu se přidávají do opalovacích krémů [18].

2.3.3 Biosyntéza karotenoidů

Biosyntetické dráhy zapojené do tvorby karotenoidů především u kvasinek byly objasněny v padesátých až šedesátých letech minulého století využitím klasických biochemických postupů. Výchozí látkou pro biosyntézu karotenoidů je acetylkoenzym A. Následně dochází ke kondenzaci jeho tří molekul. Vzniká β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA. Redukcí této sloučeniny vzniká mevalonová kyselina, poté dochází k fosforylaci a dekarboxylaci. Výsledným produktem je aktivní izopren izopentenylidifosfát. Enzymovou katalýzou přesmykuje na dimethylallyldifosfát. Kondenzací těchto dvou posledních meziproductů vzniká geranyldifosfát. Z geranyldifosfátu vzniká fytoen, který podléhá desaturaci za tvorby lykopenu. Lykopen působí jako prekurzor cyklických karotenoidů a podléhá řadě metabolických reakcí za vzniku β -karotenu, γ -karotenu, torulenu, torularhodinu a astaxanthinu. γ -karoten je prekurzorem β -karotenu a torulenu. Hydroxylace a oxidace torulenu vede k tvorbě torularhodinu. Karotenogenní dráhy u řas nejsou příliš objasněny. Některé jsou navrženy na základě chemické struktury karotenoidů [7, 16, 19, 20].



Obr. 7: Biosyntéza karotenoidů [16]

2.4 Lipidy

Lipidy jsou látky biologického původu rozpustné v organických rozpouštědlech, ale téměř nebo úplně nerozpustné ve vodě. Vhodnými rozpouštědly jsou například benzen, ether nebo chloroform. Toto rozdělení je založeno na fyzikálních vlastnostech těchto látek. Z chemického hlediska se používá dělení na dvě hlavní části. Jako lipidy jsou označovány estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů. Druhou skupinu tvoří isoprenoidy [21, 22].

2.4.1 Funkce

Lipidy mají v organismech mnoho významů. Hlavní funkcí je poskytování energie a její uchování z přijímané potravy. Přebytké lipidy se mění na acylglyceroly a ukládají se v tkáních. Dalším významným úkolem je jejich strukturní funkce, tvorba mono a dvojvrstev tvořících strukturní jádro biomembrán. Tuky dále plní ochrannou funkci. Chrání některé vnitřní orgány před mechanickým poškozením. Podkožní tuk má také izolační charakter. Zabraňuje nadměrné ztrátě tepla a vody [22].

2.4.2 Biosyntéza lipidů

Biosyntéza lipidů probíhá v cytosolu buňky a dělí se na dvě hlavní části - biosyntézu mastných kyselin, která probíhá jako kondenzace dvouuhlíkatých jednotek a syntézu triacylglycerolů, které jsou syntetizovány z esterů mastných acyl-CoA a z glycerol-3-fosfátu nebo dihydroxyacetonfosfátu [21, 22].

2.4.2.1 Biosyntéza mastných kyselin

Běžné mastné kyseliny mají obvykle sudý počet atomů uhlíku, což vyplývá z biosyntézy, která vychází z dvouuhlíkatých prekurzorů – acetyl-CoA [22].

Průběh biosyntézy lze rozdělit do tří kroků. Nejprve probíhá karboxylace acetyl-CoA na energeticky bohatší malonyl-CoA za spotřeby ATP pomocí enzymového komplexu acetyl-CoA-karboxylázy složeného ze tří funkčních podjednotek – bílkovinného nosiče biotinu, který má funkci nosiče CO_2 , biotinkarboxylázy a karboxyltransferázy [22].

Druhým krokem je syntéza palmitové kyseliny probíhající na multienzymovém komplexu syntázy mastných kyselin. Při opakujících se reakcích se z malonyl-CoA postupně syntetizuje základní šestnáctiuhlíkový řetězec palmitové kyseliny. První cyklus zahrnuje přenos acetylu z acetyl-CoA nejprve na centrální thiolovou skupinu (cSH) a poté transacylací na periferní thiolovou skupinu (pSH). V dalších cyklech je právě vytvořený acyl přenášen z cSH na pSH, čímž se cSH uvolní pro další vazbu malonylu. Uvolněný acyl z pSH se napojí na malonyl účinkem kondenzačního enzymu 3-oxoacylsyntetázy. Vznikajícím produktem je 3-oxoacyl, který se redukuje na 3-hydroxyacyl, z něhož se účinkem lyázy odštěpí molekula vody a vznikne nenasycený acyl – enoyl. Při druhé redukci je enoyl redukován na nasycený acyl. Reakce je katalyzovaná enoylreduktázou za účasti NADPH. Jednotlivé cykly jsou opakovány tak dlouho, dokud není získána vhodná délka řetězce. Poté jsou reakce zastaveny alosterickou inhibicí [22].

Třetí fáze je označovaná jako další přeměny palmitátu (elongace a desaturace), kdy dochází k uvolnění vyrobené mastné kyseliny z ACP (Acyl Carrier Protein) a je aktivovaná

reakcí s CoA za účasti ATP a katalýzy thiokinázou. Vzniklý acetyl-CoA může být dále zapojen do syntézy lipidů nebo může být využíván na vznik kyselin s delším řetězcem [22].

2.4.2.2 Biosyntéza triacylglycerolů

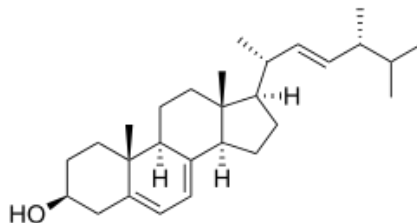
Aby mohly nově nasyntetizované mastné kyseliny plnit úlohu energetických zásob, musí být nejdříve převedeny na triacylglyceroly. Triacylglyceroly jsou syntetizovány z esterů mastných acyl-CoA a z aktivovaného glycerol-3-fosfátu nebo dihydroxyacetonfosfátu. Acyltransferáza přenáší dva acyly mastných kyselin z acyl-CoA na aktivovanou formu glycerolu a vzniká fosfatidát. Z něj je fosfatidáthydrolázou odštěpen fosfát za vzniku diacylglycerolu. Ten na sebe naváže třetí zbytek mastné kyseliny z acyl-CoA pomocí enzymu acyltransferázy a vzniká triacylglycerol [22].

2.4.3 Izoprenoidy

Izoprenoidy jsou velkou a různorodou skupinou přirozeně se vyskytujících organických chemických látek vznikajících kondenzací pěti atomů uhlíku izoprenových jednotek dále různě modifikovaných. Charakteristickým znakem izoprenoidů je jedna dvojná vazba a jeden větvcí se methyl. Do této skupiny jsou řazeny steroly, které jsou důležitou součástí membrán. Dále k této kategorii patří také karotenoidy a rovněž ubiquinon, známý jako koenzym Q₁₀ [22, 23].

2.4.3.1 Ergosterol

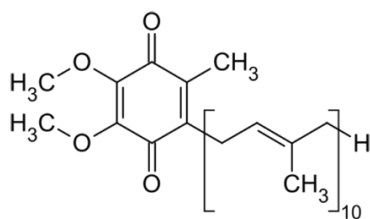
Ergosterol je steroidní látka obsažená v buněčných membránách nižších eukaryot, především kvasinek. Má podobnou funkci jako cholesterol u vyšších živočichů. Má vliv na fluiditu membrán. Ergosterol je prekurzorem vitamínu D. Ultrafialové záření iniciuje fotochemickou reakci, při které se ergosterol přemění na ergokalciferol [24].



Obr. 8: Ergosterol

2.4.3.2 Ubichinon

Ubichinon také označovaný jako koenzym Q₁₀ patří mezi koenzymy oxidoreduktáz. Obsahuje izoprenoidní postranní řetězec, a proto je řazen mezi izoprenoidy. Koenzym Q má důležitou roli v elektronovém transportním řetězci v procesu buněčného dýchání jako přenašeč elektronů [22, 23].



Obr. 9: Koenzym Q₁₀

2.5 Proteiny

Proteiny, též označované jako bílkoviny, jsou biopolymery aminokyselin vzniklé procesem proteosyntézy. Jedná se o vysokomolekulární přírodní látky, jejichž relativní molekulová hmotnost je více než 10 000. Aminokyseliny jsou v proteinech vzájemně vázané peptidovou vazbou do nerozvětvených řetězců. Dále se na struktuře proteinů podílí disulfidové, esterové a amidové vazby. Pro lidskou výživu se využívají různé zdroje. Poslední dobou se uvažuje i o netradičních zdrojích, jako jsou například řasy, konkrétně *Chlorella* [21, 25].

2.5.1 Funkce

Proteiny jsou základem většiny živých organismů. Z tohoto důvodu zastávají mnoho funkcí. Strukturní proteiny mají funkci stavebních složek buněk, tkání a pletiv. Enzymy a hormony zastupují katalytické proteiny. Další funkce je transportní, umožňuje přenos různých látek. Dále se proteiny dělí na pohybové, obranné, zásobní, výživové, senzorické nebo regulační [25].

2.5.2 Struktura

U struktury proteinů se rozeznávají čtyři úrovně – primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární struktura udává pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci. Prostorové uspořádání peptidových řetězců zajišťuje sekundární struktura. Její možné konformace jsou helikální struktury, z nichž velmi významná je α -helix, nebo β -struktury také označované jako skládaný list. Terciární struktura určuje trojrozměrné uspořádání celého polypeptidu. Mnoho proteinů je složeno z jednotlivých podjednotek, jejichž uspořádání udává kvartérní struktura [21, 25].

2.6 Stresové podmínky

Všechny buňky reagují na změny ve svém prostředí. Takovéto změny, které ohrožují existenci buňky nebo brání jejímu optimálnímu růstu, se obvykle označují jako buněčný stres. Stresové vlivy se dělí na fyzikální a chemické. Mezi fyzikální vlivy se řadí teplota, záření, osmotický stres apod. Buněčná odpověď na stres funguje jako ochrana buňky před škodlivými účinky stresu a při opravách po možném poškození [26].

2.6.1 Teplota

Vliv teploty je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících rychlost rozmnožování a růstu mikroorganismů. Každý organismus má své teplotní optimum. Vzhledem ke vztahu k teplotě rozlišujeme tři hlavní typy. Psychofilní organismy mají optimální teplotu pod 20 °C. Druhou skupinu tvoří mezofilní mikroorganismy, pro které je optimální teplota nižší než 45 °C.

Třetím typem jsou termofilní organismy, jejichž optimum se nachází v rozmezí 50 až 60 °C, výjimečně i při 80 °C [5].

Teplotní stres je způsoben vystavením buněk teplotě mimo jejich optimum, a to jak vysoké teplotě („heat-shock“) nebo nízké teplotě („cold shock“). Při zvyšování teploty roste rotační, vibrační i translační kinetická energie všech buněčných molekul. Pokud dojde ke zvýšení kinetické energie, zvýší se membránová fluidita, zvýší se metabolismus a nastanou tzv. přechody, jako je proteinová denaturace. Buňky také syntetizují tzv. proteiny teplotního šoku, které rozeznávají anomálie vzniklé po působení stresoru a účinně je odstraňují [27, 28].

2.6.2 Záření

Elektromagnetické záření se značně liší svým fyziologickým účinkem na mikroorganismy v závislosti na vlnových délkách. Infračervené záření ani Hertzovo záření nemají doposud zjištěné letální účinky. Na buňky působí pouze teplem. Viditelné světlo poskytuje energii pro fototrofní mikroorganismy. Další důležitou funkcí je podpora tvorby karotenoidních barviv. Ultrafialové záření je prokazatelně mutagenní a letální. Nejsilnější mutagenní a letální vliv má záření o vlnové délce, která je nejvíce absorbována nukleovými kyselinami. Roentgenovo záření, γ -záření a kosmické záření jsou silnými mutageny a také vykazují smrtící účinky [5].

2.6.3 Osmotický stres

Osmotický stres je způsoben změnami koncentrace rozpuštěných molekul v okolním prostředí buňky, čímž dochází ke změně dostupnosti vody. Zvýšení osmotické koncentrace vede ke snížení aktivity vody a vodnímu potenciálu. Naopak snížením osmolarity zvýšíme aktivitu vody. Vzhledem k tomu, že biologické membrány jsou propustnější pro vodu než většinu rozpuštěných látek, jsou buňky ovlivněny změnami celkové koncentrace rozpuštěných látek. V důsledku toho způsobuje zvýšení vnější osmotické koncentrace (hyperosmotický stres) odtok vody z buňky, zatímco snížení vnější osmolarity (hypoosmotický stres) vede k nasávání vody [26].

2.7 Metody analýzy

2.7.1 GC/FID

Plynová chromatografie je technika k oddělení složek směsi, jejímž účelem je získání informací o jejich molekulovém složení a množství. Po převedení vzorku do plynné fáze je vzorek separován distribucí mezi stacionární a mobilní plynnou fází. Jsou rozlišovány dvě skupiny plynové chromatografie – adsorpční plynová chromatografie (plyn-pevná stacionární fáze) a rozdělovací plynová chromatografie (plyn-kapalina stacionární fáze) [29, 30].

Při separaci látek se vzorek nastříkne do vyhřívaného bloku (injektoru), kde se odpaří a ve formě par je unášen inertním nosným plynem ke konci kolony. Složky, které vychází z kolony, jsou jednotlivě detekovány detektorem [31].

Často užívaným detektorem u plynové chromatografie je plamenový ionizační detektor (FID). Detekovaný vzorek je spalován vodík-vzduchovým plamenem, který hoří mezi dvěma elektrodami – anodou a katodou. Molekuly organických látek tvoří v plamenu radikály, které přechází na ionty. Těmi je zvyšována vodivost plamene a detektorem prochází proud úměrný koncentraci analyzované látky v nosném plynu [31].

2.7.2 HPLC/PDA

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je další separační technikou. Principem separace je dělení analytu mezi stacionární a mobilní fázi, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvena v koloně. Při separaci vzorek interaguje s mobilní fází, se stacionární fází a také dochází k sorpci na stacionární vrstvu. Po průchodu separační kolonou jsou analyzované látky detekovány detektorem [31].

U kapalinové chromatografie jsou rozlišovány čtyři hlavní systémy podle mechanismu separace – kapalinová adsorpční chromatografie (LSC), kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC), gelová permeační chromatografie (GPC) a iontově výměnná chromatografie (IEC) [31].

Detektor diodového pole patří k spektrofotometrickým detektorům. Tento typ detektorů umožňuje kontinuální skenování celého spektra v reálném čase. Výhodou je vysoká univerzálnost a citlivost [31, 32].

2.7.3 Stanovení celkových proteinů

Metody stanovení celkových proteinů lze rozdělit do pěti skupin. Do první skupiny se řadí metody založené na interakci proteinů s ionty mědi. Zástupci skupiny jsou Hartree-Lowryho metoda, biuretová metoda a bicinchoninová metoda. Druhou skupinu tvoří ninhydrinové metody po kyselé hydrolyze proteinů. Další kategorii zastupuje stanovení z UV spektra. Čtvrtou část reprezentuje metoda Bradfordové s vazbou barviva Coomassie blue na proteiny. Poslední skupina obsahuje stanovení celkových proteinů ze sušiny [33].

2.7.3.1 Hartree-Lowryho metoda

Hartree-Lowryho metoda využívá účinek tří činidel. První dvě činidla jsou využívány také ke stanovení biuretovou metodou. Třetí složkou činidel je Folin-Ciocalteu činidlo na fenoly. Je tvořeno fosfomolybdenovou a fosfowolframovou kyselinou, které redukují tyrosinovými zbytky proteinů a barví se modře. Stanovení má lineární odezvu v širším rozsahu koncentrací [33].

2.7.4 Absorpční spektrofotometrie UV-VIS

Princip metody spočívá v absorpci viditelného a ultrafialového záření analytem a následném měření poklesu intenzity záření v rozmezí 200 – 800 nm. Fotony z elektromagnetického záření ve viditelné a ultrafialové oblasti mají dostatečné množství energie, aby excitovaly elektronové, vibrační i rotační stavy molekul [34].

Zdrojem záření jsou pro ultrafialovou oblast vodíková nebo deuteriová výbojka, která je častější. U viditelné oblasti se využívá wolframová nebo halogenová žárovka. Funkci dispersního prvku obvykle plní mřížkový monochromátor. Detektor tvoří nejčastěji fotonka nebo fotonásobič. Použité kyvety nesmí absorbovat záření. Z tohoto důvodu se v ultrafialové oblasti využívají křemenné kyvety [34].

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce zaměřené na kultivaci autotrofních řas a karotenogenních kvasinek bylo řešení následujících dílčích kroků:

- Kultivace vybraných druhů řas a kvasinek včetně testování možností kokultivace
- Analýza obsahu vybraných metabolitů - lipidů, pigmentů, sterolů a bílkovin
- Srovnání produkce metabolitů řasami a kvasinkami za různých fyzikálních podmínek

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

4.1.1 Kultivace kvasinek

Analytické váhy – Boeco, Německo

Box Aura mini – BioTech, Česká republika

Centrifuga U-32R – Boeco, Německo

Spektrofotometr VIS Helios δ – Unicam, Velká Británie

Třepačka Yellow line – Labicom s.r.o., Německo

4.1.2 Kultivace řas

Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI – Česká republika

- Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm
- LED diodový zdroj
- Stojan pro 8 zkumavek 80 ml
- Termostat s vodní lázní
- Vzduchová pumpa
- Zásobník na destilovanou vodu

4.1.3 Izolace a analýza vybraných metabolitů

HPLC/PDA sestava

- Sestava HPLC/MS – Thermo Scientific, USA
- Termostat LCO 101, Column Oven – ECOM, Česká republika
- PDA Plus Detector – Thermo Scientific, USA
- MS Pump Plus – Thermo Scientific, USA
- Předkolona C18, AJ0 4287 – Phenomenex, USA
- Držák předkolony KJ0 4282 – ECOM, Česká republika
- Kolona Kinetex C18, 5 mm 4,6 x 150 mm

GC/FID sestava

- Sestava GC – ThermoQuest S. p. A., Itálie
- Detektor FID
- Kapilární kolona ZB-WAX plus

Vakuová odparka RV 06 – IKA, Německo

Vodní lázeň EL-20 – Merci a.s., Česká republika

4.2 Použité chemikálie

4.2.1 Kultivace kvasinek a řas

D-glukosa monohydrát p.a. – PENTA s.r.o.

Síran hořečnatý heptahydrát p.a. – Lach-Ner s.r.o.

Síran amonný p. a. – Lach-Ner s.r.o.

Dihydrogenfosforečnan draselný p. a. – Lach-Ner s.r.o.

Kvasničný autolyzát – HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

Močovina p. a. – PENTA s.r.o.
Chlorid sodný p. a. – PENTA s.r.o.
Hydrogenfosforečnan draselný p. a. – Lachema a.s.
Dusičnan sodný p. a. – Lach-Ner s.r.o.
Chlorid vápenatý dihydrát p. a. – Lachema a.s.

4.2.2 Extrakce a transesterifikace

Methanol p. a. – Lach-Ner s.r.o.
Chloroform p. a. – Lach-Ner s.r.o.
Hexan pro HPLC – VWR Chemicals
Hydroxid draselný p. a. – Lach-Ner s.r.o.

4.2.3 HPLC

Acetonitril pro HPLC – Lach-Ner s.r.o.
Methanol pro HPLC – VWR Chemicals
Chloroform pro HPLC – Lach-Ner s.r.o.

4.2.4 Stanovení celkových proteinů

Albumin 98% – Sigma-Aldrich s.r.o.
Uhličitan sodný – Lach-Ner s.r.o.
Hydroxid sodný – Lach-Ner s.r.o.
Vinan sodno-draslený tetrahydrát p. a. – PENTA s.r.o.
Síran měďnatý pentahydrát – Lach-Ner s.r.o.

4.3 Použité kmeny mikroorganismů

4.3.1 Použité kmeny kvasinek

Rhodotorula aurantiaca CCY 20-9-7
Xanthophyllomyces dendrorhous CCY 77-1

4.3.2 Použité kmeny řas

Chlorella vulgaris CCALA 258
Chlamydomonas reinhardtii CCALA 928

4.4 Kultivace mikroorganismů

4.4.1 Kultivace kvasinek

Kvasinky rodu *Rhodotorula* a *Xanthophyllomonas* se řadí k mezofilním aerobním mikroorganismům s obdobnými nároky na růst. Při měření růstových křivek byly kvasinky kultivovány v tekutém médiu při laboratorní teplotě za neustálého osvětlení a třepání. Vzhledem k použitým stresům byly podmínky kultivace optimalizovány. Při teplotních stresech byla kultivace prováděna při 8 °C a 30 °C. Při osmotických stresech byl použit 2%, 3%, 4% a 5% roztok chloridu sodného. Při stresech ozářením byly kvasinky kultivovány

ve tmě a při intenzivním záření. Při kombinaci stresů byla kultivace provzdušňována a různě osvětlována při $0 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $250 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Před naočkováním byla použitá média sterilována v talkovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 60 minut.

4.4.1.1 Inokulum I a II

Každá kultivace byla zahájena dvoustupňovou inokulací. Nejprve bylo připraveno inokulum I, kde byla v laminárním boxu zaočkována zásobní kultura z Petriho misek, a to vždy jedna klička na 10 ml inokulačního média. Poté byla kultura sterilně přelita do inokulačního média II, a to v poměru 1:5. Kultivace v inokulu I a inokulu II probíhala 24 hodin. Složení médií je uvedeno v tab. 2. Při kultivaci kmene *Xanthophyllomonas* je přidána složka navíc – močovina, a to v množství 3,5 g/l.

Tab. 2: Složení inokula I a II

Složka	Množství
Voda z vodovodu	1000 ml
Glukóza	40 g
Kvasničný autolyzát	7 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
KH_2PO_4	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,696 g

4.4.1.2 Produkční médium

Po ukončení kultivace v inokulu II byla kultura sterilně přeočkována do produkčního glukózového média v poměru 1:5. V první fázi byly stanoveny růstové křivky, na jejichž základě byl stanoven čas odběru pro stresové podmínky, a to v 90. hodině. Složení produkčního média je uvedeno v tab. 3. Stejně jako u inokula I a II byla při kultivaci rodu *Xanthophyllomonas* do produkčního média přidávána močovina v množství 3,5 g/l. Kultivace byla prováděna v Erlenmeyerových baňkách v 50 ml kultivačního média.

Tab. 3: Složení produkčního média kvasinek

Složka	Množství
Voda z vodovodu	1000 ml
Glukóza	30 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4 g
KH_2PO_4	4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,696 g

4.4.2 Kultivace řas

Rod *Chlorella* a *Chlamydomonas* patří mezi autotrofní mikroorganismy s podobnými požadavky na růst. Řasy byly kultivovány při laboratorní teplotě za neustálého vzdušnění a osvětlení. V rámci srovnání stresových faktorů řas a kvasinek byly použity stresy obdobné, jako při kultivaci kvasinek. Při teplotních stresech byla kultivace prováděna při 8 °C. Při

osmotických stresech byl použit 2%, 3%, 4% a 5% roztok chloridu sodného. Při stresech ozářením byly řasy vystaveny intenzivnímu záření $500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Použitá média slouží jako inokulační i produkční a byla dvakrát sterilovaná v autoklávu.

4.4.2.1 Kultivační médium

Kultivace řas probíhala ve dvou fázích. Nejprve byly ze zásobních zkumavek s pevným médiem zaočkovány vybrané druhy řas do Erlenmeyerovy baňky, ve které byly kultivovány za neustálého třepání a osvětlení po dobu 14 dnů. Následně bylo odebráno určité množství inokula právě tak, aby se absorbance výsledného kultivačního média blížila k hodnotě 0,1. Složení produkčního média je uvedeno v tab. 4.

Tab. 4: Složení kultivačního média řas

Složka	Koncentrace g/l
NaNO ₃	0,75
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,025
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
KH ₂ PO ₄	0,175
NaCl	0,01
Na ₂ -EDTA · 2 H ₂ O	$4,5 \cdot 10^{-3}$
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	$5,82 \cdot 10^{-4}$
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	$2,46 \cdot 10^{-4}$
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	$2,4 \cdot 10^{-5}$
ZnCl ₂	$3 \cdot 10^{-5}$
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	$1,2 \cdot 10^{-5}$

4.4.2.2 Multikultivátor MC-1000 OD, Photon Systems Instruments

Pro kultivaci řas byl využit multikultivátor – fotobioreaktor s osmi paralelně zapojenými kultivačními nádobami, které jsou samostatně osvětleny a aerovány. Tyto zkumavky jsou umístěny v temperované vodní lázni. Během kultivace je měřena absorbance při 680 nm (odpovídá absorbanci chlorofylu) a 720 nm (rozptyl světla) ve zvolených časových intervalech.

Do zkumavek bylo sterilně nalito 80 ml kultury řas, zředěné na optickou hustotu 0,1. Kultivace byla ukončena po dosažení stacionární fáze.



Obr. 10: Multikultivátor MC 1000-OD [35]

4.4.3 Kokultivace

Možnosti kokultivace byly provedeny ve dvou variantách. V prvním případě byly mikroorganismy očkované podle počtu buněk v poměru $5 \cdot 10^4$ kvasinek a $5 \cdot 10^5$ řas. Pro určení počtu buněk byl využit průtokový cytometr. Při druhém pokusu byly mikroorganismy očkované podle optické hustoty. Kvasinky byly očkované konstantně na OD 0,3 a řasy v rozsahu 0,3 až 0,6. Kultivace probíhala po dobu jednoho týdne, kdy po čtyřech dnech byl sterilně odebrán kontrolní vzorek. Kultivační médium obsahovalo BBM médium s přidavkem glukózy o koncentraci 30 g/l a v případě kokultivací s kvasinkou *Xanthophyllomyces* bylo navíc přidáno 3,5 g/l močoviny. Kokultivace probíhala v Erlenmeyerových baňkách. Objem kultivačního média činil 50 ml.

4.4.4 Růstové křivky

Růstové křivky byly stanoveny pro všechny výše zmíněné kmeny. U kvasinek se vzorky odebíraly po zaočkování do produkčního média v předem stanovených časových intervalech. 10 ml vzorku bylo pipetováno do centrifugační zkumavky a poté centrifugováno při 4500 otáčkách po dobu 5 minut. Poté byl odlit supernatant. Buňky byly promyty 5 ml destilované vody a opět centrifugovány. Takto promytá biomasa byla rozsuspendovaná v 1 ml destilované vody a přelita na předem vysušenou a zváženou hliníkovou misku. Množství biomasy bylo stanoveno gravimetricky. Centrifugační zkumavka byla vypláchnuta 1 ml destilované vody a převedena ke zbytku objemu, aby nedocházelo ke ztrátám při manipulaci se vzorkem. Dále byl odebrán 1 ml vzorku na stanovení turbidity spektrofotometricky při 630 nm.

U řas byla růstová křivka stanovena obdobně. Vzorky byly odebírány po 24 hodinách po 10 ml pro stanovení biomasy gravimetricky. Zákal byl stanovován přímo pomocí multikultivátoru. Získaná data byla zpracována pomocí programu MS Excel 2013.

4.5 Metody stanovení biomasy a metabolitů

4.5.1 Extrakce

Extrakce vzorků byla provedena metodou podle Folche. Vzorek biomasy byl extrahován směsí rozpouštědel, konkrétně chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Buňky byly dezintegrovány pomocí skleněných kuliček po dobu 45 minut na vortexu. Obsah centrifugační

zkumavky byl přelit do čisté zkumavky. Skleněné kuličky byly promyty 2 ml směsí chloroformu s methanolem a vzniklý roztok byl přelit k původně odlitému extraktu. Takto vzniklá směs byla centrifugována při 7 000 ot./10 s, čímž došlo k vytvoření dvou fází. Spodní vrstva byla odpipetovaná do slzičkové baňky a směs rozpouštědel se odpařila pomocí vakuové odparky. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml chloroformu.

4.5.2 Transesterifikace

Z vyextrahovaného vzorku rozpuštěného ve 2 ml chloroformu bylo odebráno 0,5 ml a přidáno k 4,5 ml hexanu pro HPLC. Následně bylo přidáno 0,5 ml 2M hydroxidu draselného rozpuštěného v methanolu. Vzniklá směs byla po dobu osmi minut protřepávána. Vzorek byl 10 minut ponechán v klidu, aby došlo k rozdělení fází. Pro analýzu pomocí plynové chromatografie byl odebrán 1 ml vrchní fáze do vialky.

4.5.3 Stanovení karotenoidů, sterolů a chlorofylu

Pro analýzu karotenoidů a sterolů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byl vysušený extrakt rozpuštěn ve 2 ml chloroformu chromatografické kvality a zfiltrován. Pro analýzu byla použita sestava HPLC od firmy Thermo Fischer Scientific. Vzorek byl dávkován smyčkou o objemu 20 µl na nepolární kolonu uloženou v termostatu vyhřátém na 45°C. Mobilní fáze sestávala z 80 % acetonitrilu, 15 % methanolu a 5 % chloroformu. Průtok byl nastaven na 1000 µl/min. Použitý detektor patří mezi spektrofotometrické detektory, konkrétně se jednalo o detektor s diodovým polem. K vyhodnocení naměřených dat byl použit program Xcalibur. Získaná data byla vyhodnocena na základě porovnání se standardy β-karotenu, ergosterolu a ubichinonu. U řas byl obdobně stanoven také chlorofyl. Ke stanovení celkové koncentrace karotenoidů byla využita kalibrační křivka β-karotenu na základě podobnosti struktur mezi jednotlivými karotenoidy z důvodu komerční nedostupnosti a finanční náročnosti.

4.5.4 Stanovení lipidů

Stanovení lipidů bylo provedeno plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem. Při analýze byla použita kapilární kolona ZB-WAXplus dlouhá 30 m. Teplotní program začínal na 60°C s výdrží 10 minut, následně byl třikrát navýšen teplotní gradient. Nejprve 12°C za minutu do 200°C po dobu 10 minut, poté 5°C za minutu do 220°C 15 minut a na závěr 10°C/min do 240°C s výdrží 2 minut. Plamenový ionizační detektor měl následující podmínky: 275°C, průtok dusíku 30 ml/min, průtok vodíku 35 ml/min a průtok vzduchu 350 ml/min. Celková analýza probíhala jednu hodinu. Vyhodnocování probíhalo v programu Xcalibur.

4.5.5 Stanovení proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Hartree-Lowryho metody. K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A, které sestává z 2 g vinanu sodno-draselného tetrahydrátu, 100 g Na₂CO₃, 500 ml 1M NaOH, vše doplněné destilovanou vodou na 1 l. Poté byl roztok inkubován ve vodní lázni při 50°C. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,1 ml činidla B tvořeného 2 g vinanu sodno-draselného tetrahydrátu, 1 g síranu měďnatého pentahydrátu, 10 ml 1M hydroxidu sodného, doplněného

destilovanou vodou do 100 ml. Vzniklý roztok byl promíchán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly přidány 3 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Roztok byl promíchán a inkubován opět ve vodní lázni 10 minut při 50°C. Poté byl vzorek ochlazen na laboratorní teplotu. Kalibrační křivka byla sestavena stejným principem s použitím roztoku 98% albuminu o koncentracích 0,15 – 0,45 mg/ml. Absorbance byla měřena při 650 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

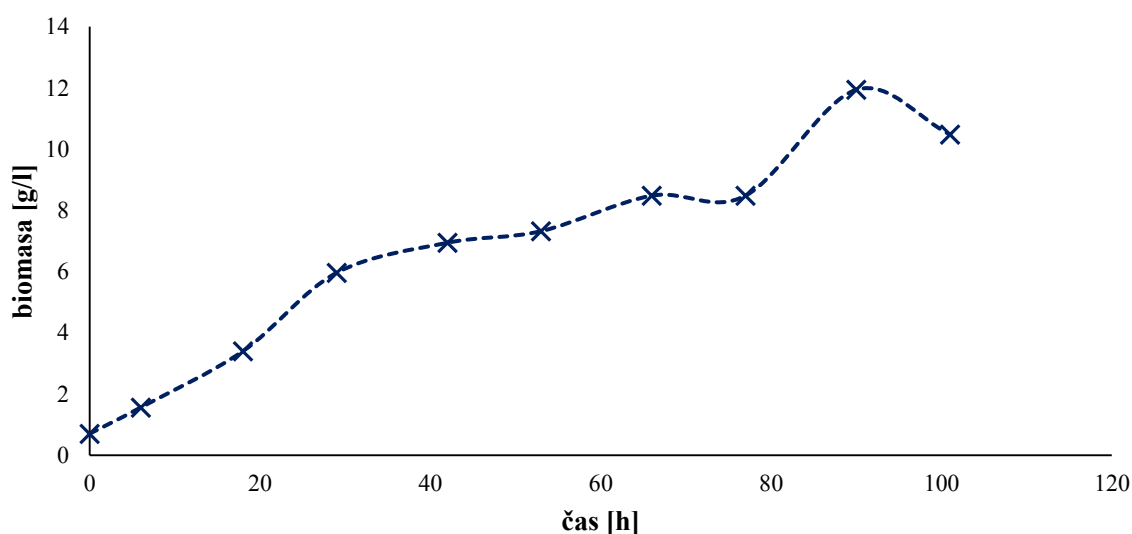
5.1 Růstové křivky kvasinek

Pro charakterizaci růstu buněčných kultur se využívá závislost nárůstu biomasy na čase, tzv. růstové křivky. Její stanovení je důležité jak pro charakterizaci buněčné fyziologie mikroorganismu, tak pro analýzu produkovaných metabolitů.

Růstové křivky byly sestaveny pro kmeny kvasinek *Xanthophyllomyces dendrorhous* a *Rhodotorula aurantiaca* podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.4.

5.1.1 Růstová křivka *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Závislost nárůstu biomasy na čase *X. dendrorhous*

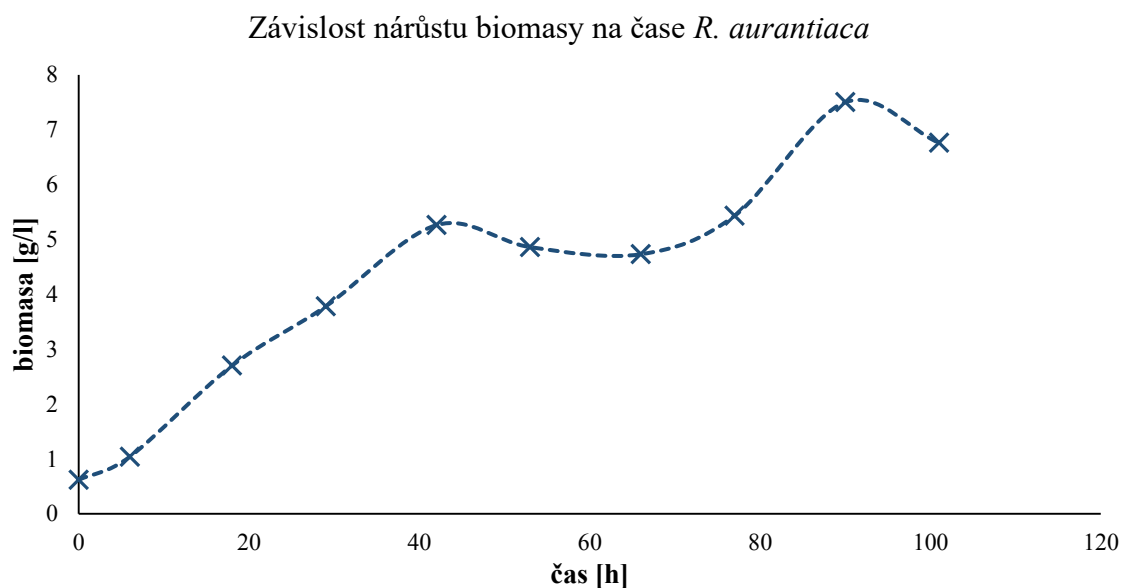


Graf 1: Závislost nárůstu biomasy na čase u *X. dendrorhous*

Z grafu 1 je zjevné, že růstová křivka kvasinky *X. dendrorhous* má charakter diauxie. Tento jev je charakteristický dvojitým přechodem do exponenciální fáze. Po dosažení prvního růstového maxima dochází k vyčerpání glukózového zdroje energie. Následně je zaznamenán mírný pokles nárůstu biomasy, kdy se buňky dostávají do druhé lag-fáze, adaptují se na nové podmínky a produkují enzymy pro využití energeticky náročnějších látek. Poté se opět začínají exponenciálně množit a dosahují druhého růstového maxima [3, 5].

Kvasinka *Xanthophyllomyces dendrorhous* vykazuje exponenciální růst do prvního maxima přibližně ve 32. hodině, kdy nejspíše došlo ke spotřebě glukózy v médiu. Druhý výrazný nárůst biomasy je zaznamenán od 75. hodiny. Zde svého maxima dosahuje v 90. hodině s produkcí biomasy nepřekračující 12 g/l. Tento čas byl vybrán jako odběrový pro následné analýzy vlivu stresových faktorů. Poté již dochází k zastavení růstu a množství biomasy začíná klesat.

5.1.2 Růstová křivka *Rhodotorula aurantiaca*



Graf 2: Nárůst biomasy v závislosti na čase kvasinky *R. aurantiaca*

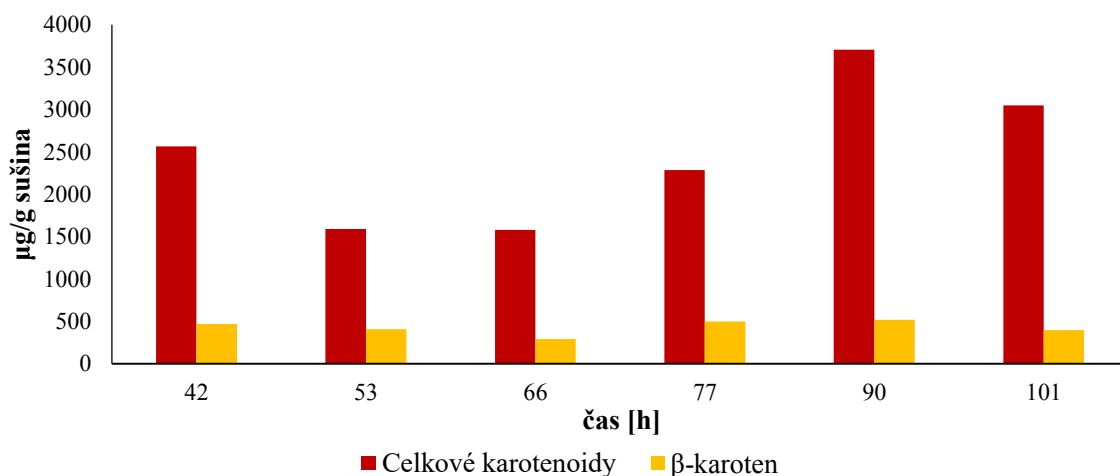
Stejně jako kvasinka *X. dendrorhous* vykazuje *R. aurantiaca* diauxii růstové křivky. Prvního maxima dosahuje ve 42. hodině, kdy se zastavuje její exponenciální růst, dochází k vyčerpání zdroje uhlíku, který je snáze využíván a kvasinka se opět dostává do lag-fáze. Po adaptaci na nové podmínky v produkčním médiu dochází opět k exponenciálnímu nárůstu. Svého maxima *R. aurantiaca* dosahuje stejně jako *X. dendrorhous* v 90. hodině kultivace.

5.2 Produkce vybraných metabolitů v průběhu růstu kvasinek

Z biotechnologického hlediska je během stanovování růstové křivky důležité rovněž kvantifikovat vybrané metabolity a stanovit čas jejich nadprodukce. Proto kromě množství biomasy jsou také analyzovány produkce karotenoidů, ergosterolu, ubiquinonu, mastných kyselin a proteinů.

5.2.1 Produkční charakteristika *X. dendrorhous*

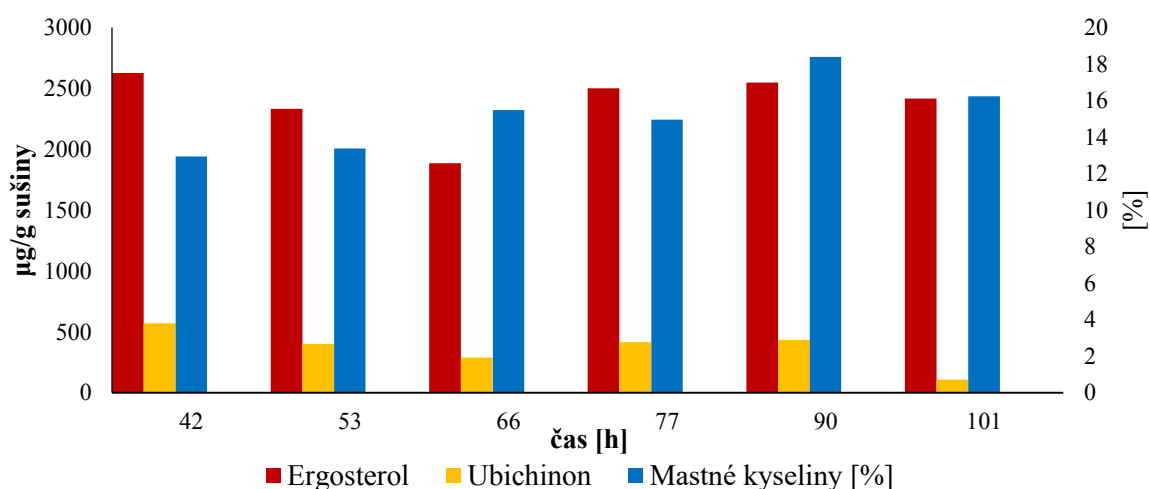
Závislost množství karotenoidů a β -karotenu na čase *X. dendrorhous*



Graf 3: Závislost produkce karotenoidních látek na čase – *X. dendrorhous*

Produkce karotenoidů vykazuje stejnou tendenci jako růst biomasy. Nejvyšší množství 3 707,1 $\mu\text{g/g}$ sušiny zaznamenáváme v 90. hodině. Při kultivaci β -karotenu nejsou patrné výraznější změny.

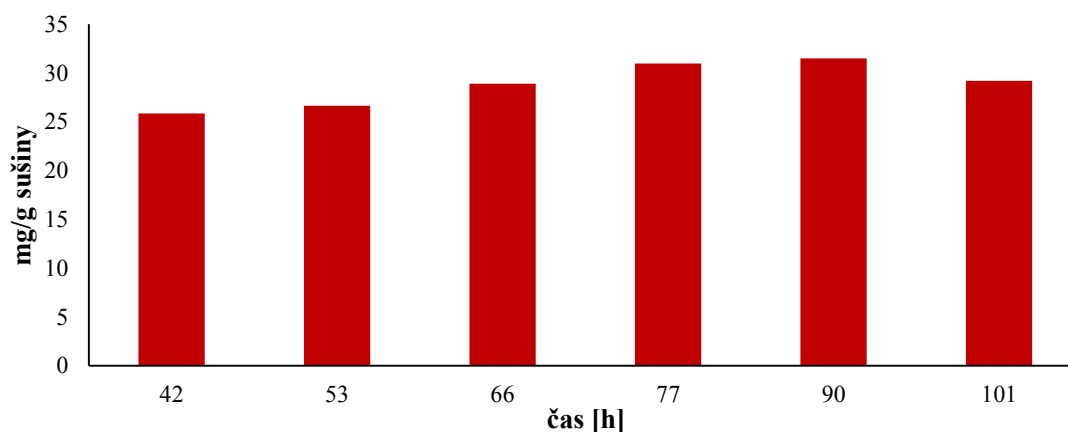
Závislost produkce lipidických látek na čase kvasinky *X. dendrorhous*



Graf 4: Závislost produkce lipidických látek na čase – *Xanthophyllomyces*

V průběhu kultivace dochází k postupnému zvyšování obsahu mastných kyselin, a to až na 18 % sušiny buněk v 90. hodině. Podobný trend vykazuje rovněž ergosterol. V rámci analýzy ubiquinonu nedochází k jeho výrazným produkčním změnám. Až při posledním odběru je zaznamenán pokles, což pravděpodobně souvisí s přechodem buněk do fáze odumírání.

Závislost množství proteinů na čase kvasinky *Xanthophyllomyces*



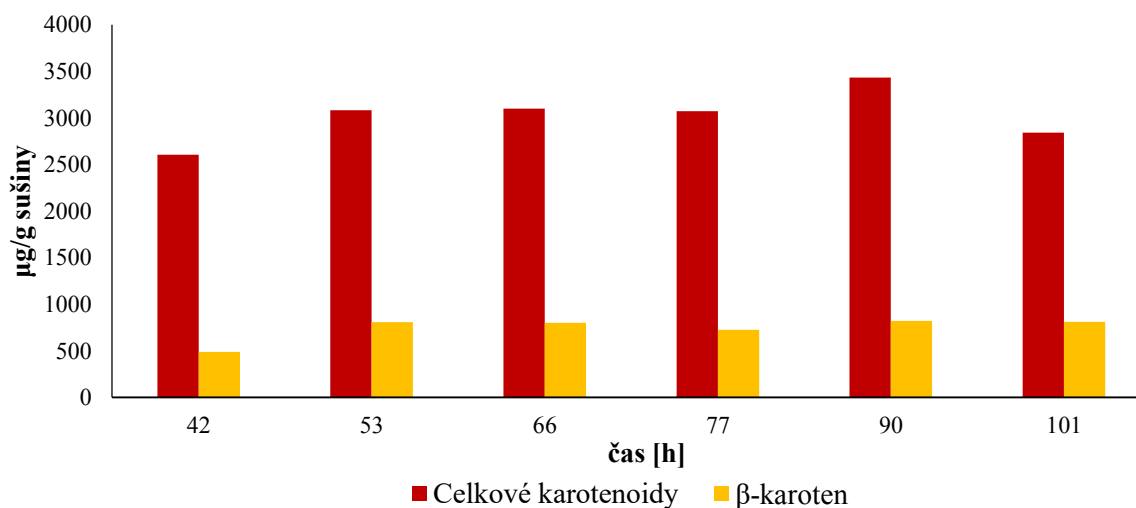
Graf 5: Produkce proteinů v čase – *X. dendrorhous*

V grafu 5 můžeme pozorovat mírný nárůst proteinů k 90. hodině, kdy je množství proteinů 31,48 mg/g sušiny. Poté již dochází k poklesu v závislosti na odumírání buněk.

Ve výše uvedených grafech (*Graf 3-5*) jsou uvedeny veškeré analyzované metabolity. Všechny produkované látky dosahují svého maxima v 90. hodině. Jejich produkce koresponduje s množstvím biomasy. U celkových karotenoidů je patrný velmi výrazný nárůst od 66. hodiny, zatímco u ostatních produktů není navýšení množství tak značné.

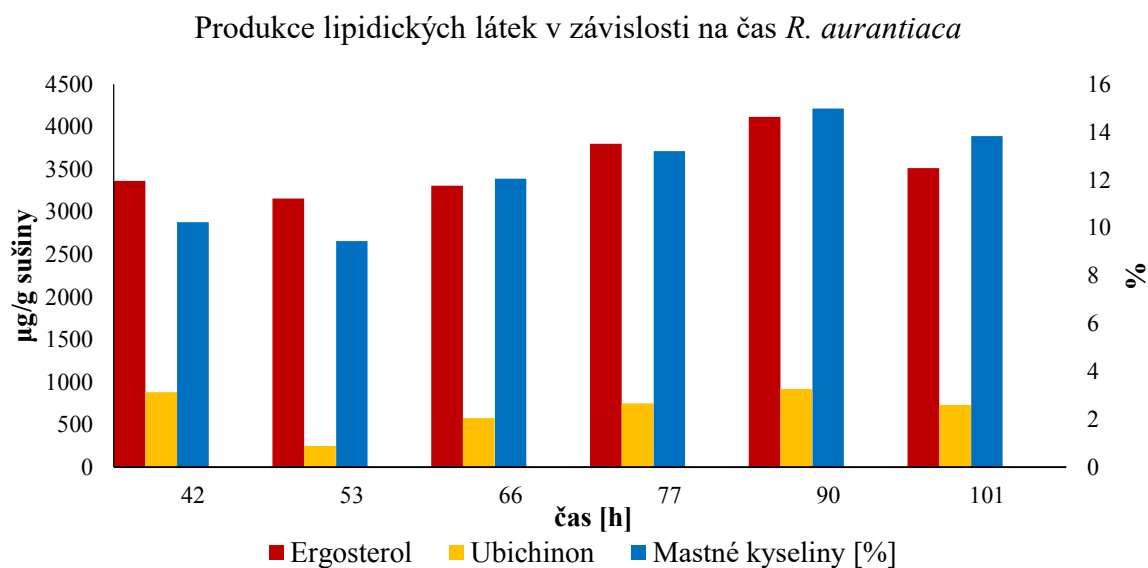
5.2.2 Produkční charakteristika *R. aurantiaca*

Závislosti množství karotenoidů a β -karotenu na čase *R. aurantiaca*



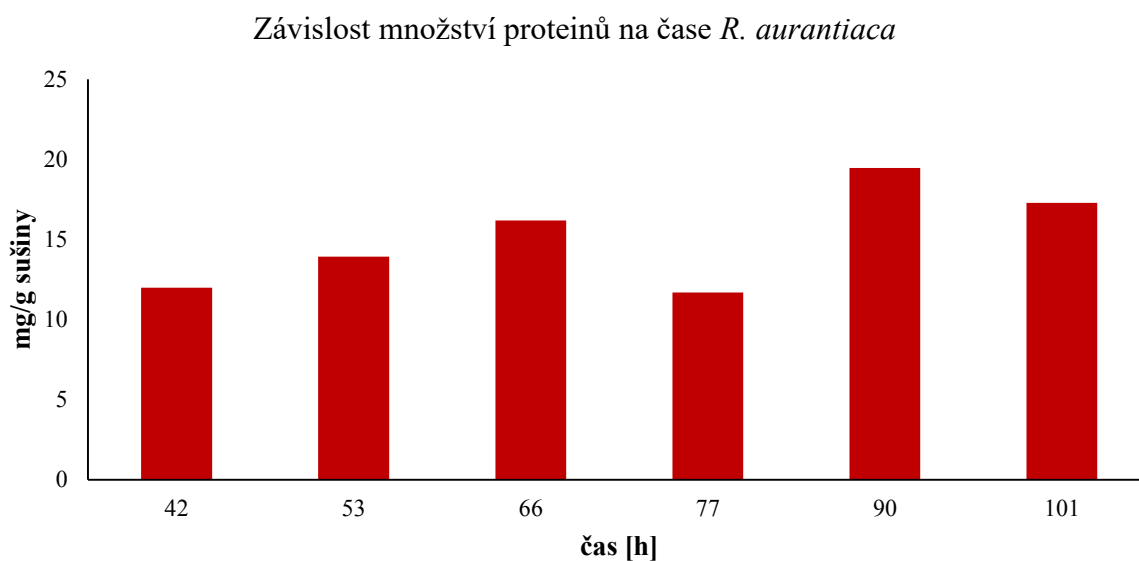
Graf 6: Produkce karotenoidních látek v závislosti na čase - *Rhodotorula*

Množství β -karotenu se v sledovaném úseku téměř nemění (*Graf 6*). Při produkčním maximu dosahuje 823,7 $\mu\text{g/g}$ sušiny. Také u celkových karotenoidů nedochází k výraznějšímu nárůstu. Nejvyšší koncentrace v 90. hodině představuje 3 432,2 $\mu\text{g/g}$ sušiny.



Graf 7: Nárůstu lipidických látek v čase – *Rhodotorula*

Ergosterol, ubichinon i mastné kyseliny vykazují stejný trend produkce, kdy po 42. hodině nastává mírný pokles koncentrace látek a poté od 53. hodiny opět narůstá do maxima v 90. hodině. Při nejvyšší produkci tvoří ergosterol 4 115,2 µg/g sušiny, ubichinon 916,8 µg/g sušiny a mastné kyseliny téměř 15 %.



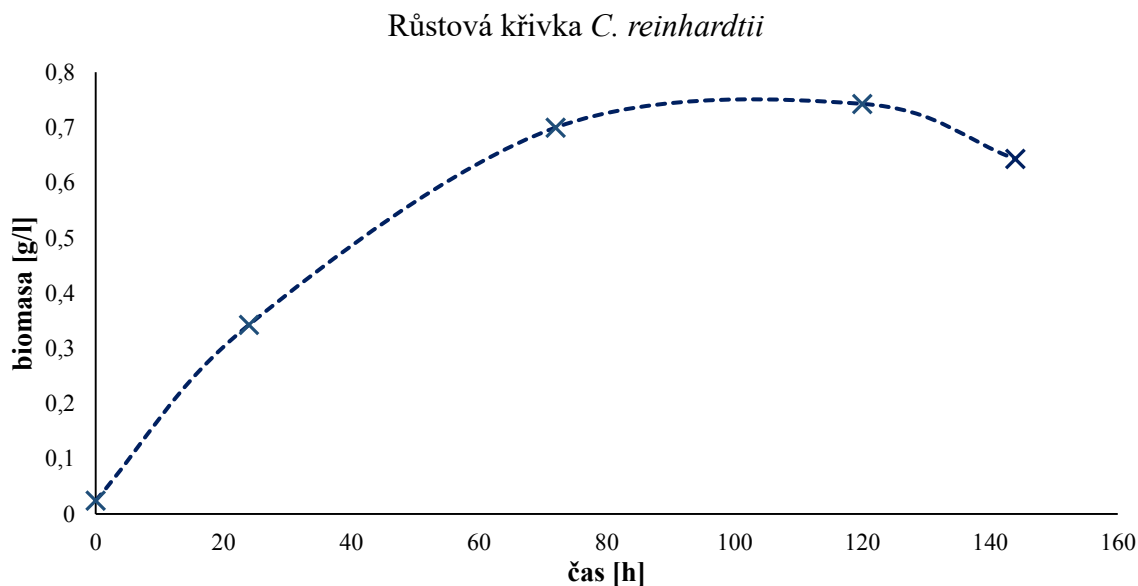
Graf 8: Produkce celkových proteinů v závislosti na čase u *Rhodotorula*

V grafu 8 můžeme pozorovat výrazný pokles v 77. hodině kultivace, poté nastává značný nárůst do maxima v 90. hodině, kde proteiny tvoří 19,5 mg/g sušiny. Průběh odpovídá produkci biomasy.

5.3 Růstové křivky řas

Růstové křivky byly stanoveny pro kmeny řas *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella vulgaris* dle postupu uvedeného v kap. 4.4.4.

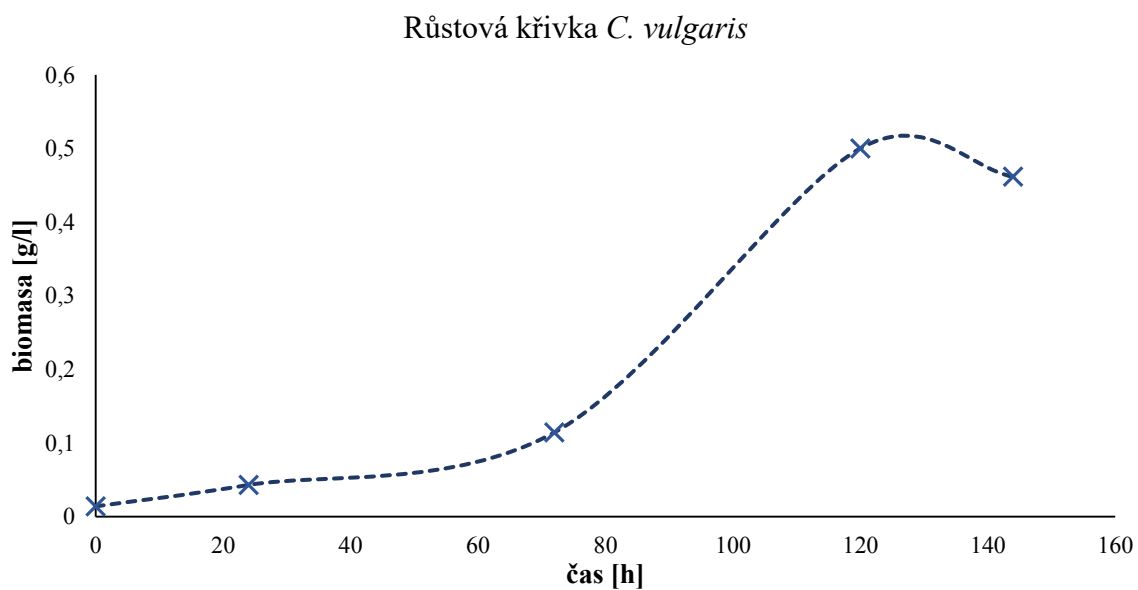
5.3.1 Růstová křivka *C. reinhardtii*



Graf 9: Nárůst biomasy v závislosti na čas - *Chlamydomonas*

Nárůst biomasy u *Chlamydomonas reinhardtii* dosahuje maxima v devadesáté hodině kultivace (viz Graf 9), kde množství biomasy odpovídá 0,74 g/l. Poté se růst dostává do stacionární fáze a po 125. hodině dochází k odumírání buněk.

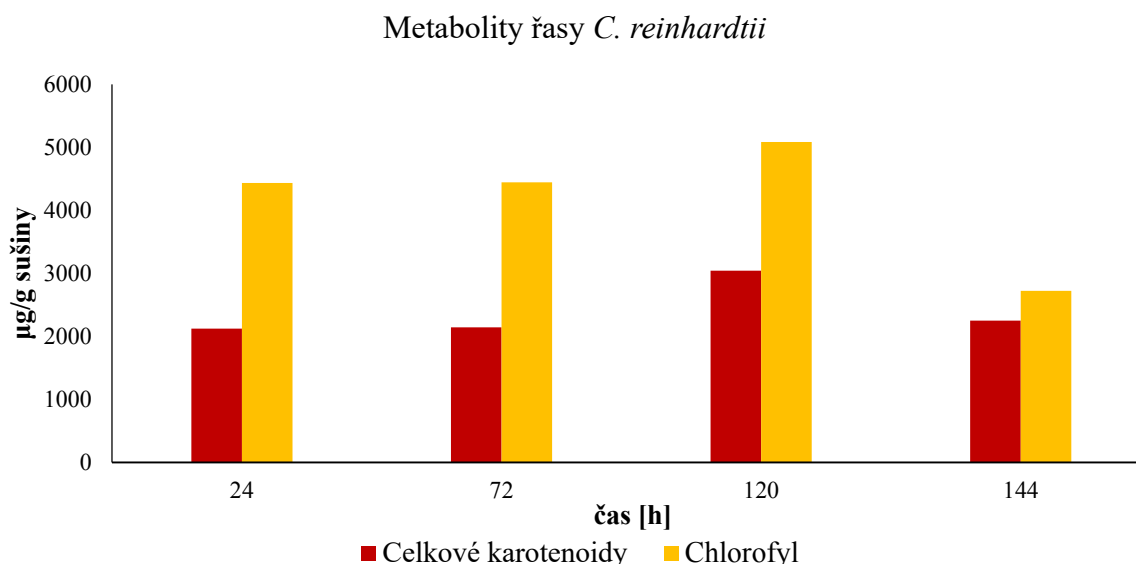
5.3.2 Růstová křivka *C. vulgaris*



Graf 10: Nárůst biomasy v čase – *Chlorella*

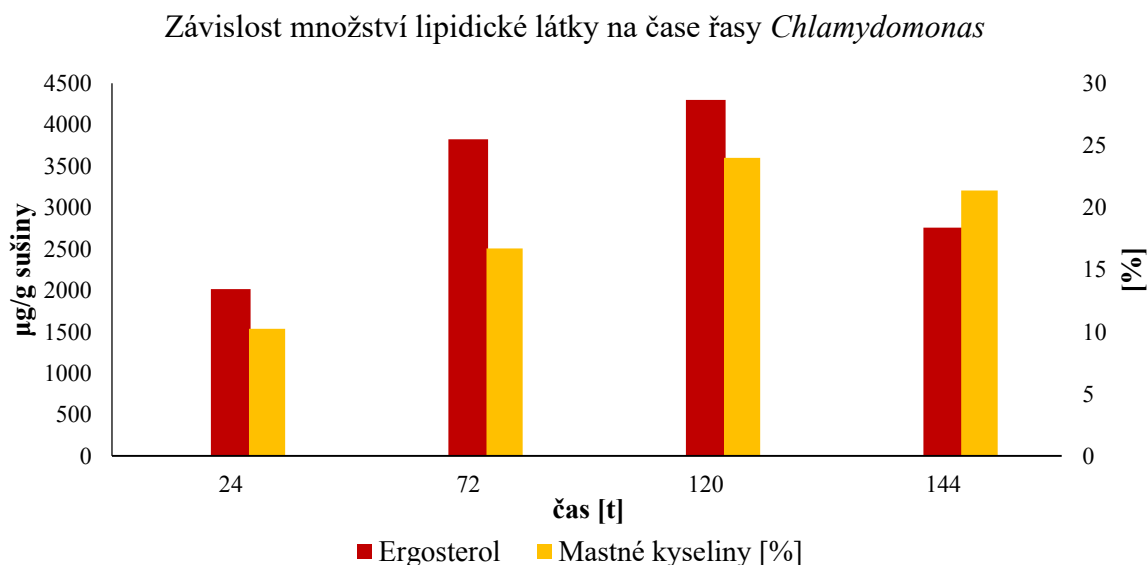
V prvních dvou dnech kultivace je růst biomasy mírný, jak je vidět v grafu 10. Poté se množství buněk zvyšuje mnohem výrazněji. Následně exponenciální růst ustává a *C. vulgaris* se dostává do stacionární fáze. Maximum růstové křivky se nachází ve 127. hodině a množství biomasy mírně překračuje hranici 0,5 g/l.

5.4 Produkční charakteristika řasy *C. reinhardtii*



Graf 11: Nárůst metabolitů v závislosti na čase – *Chlamydomonas*

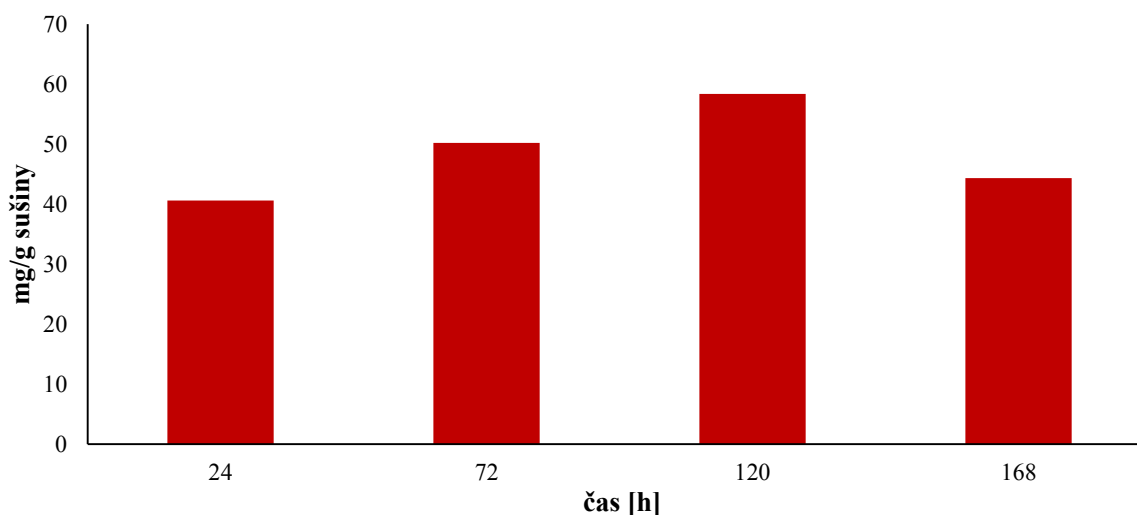
Z výše uvedeného grafu 11 můžeme pozorovat mírný nárůst celkových karotenoidů a také chlorofylu až do maxima ve 120. hodině. Po dosažení maxima obsah chlorofylu výrazně klesá, zatímco u celkových karotenoidů je pokles nižší. Nejvyšší koncentrace celkových karotenoidů je 3 043,3 µg/l. Maximální množství chlorofylu odpovídá 5 098,8 µg/l.



Graf 12: Závislost nárůstu lipidických látek v čase – *Chlamydomonas*

Lipidické látky projevují obdobný průběh až k maximu v 120. hodině kultivace (*Graf 12*). Ergosterol dosahuje hodnoty 4 300,3 $\mu\text{g/l}$ a mastné kyseliny tvoří 24,01% obsahu sušiny. Poté nastává výrazný pokles ergosterolu. Procentuální obsah mastných kyselin zůstává po dosažení maxima téměř totožný.

Závislost množství proteinů na čase *C. reinhardtii*

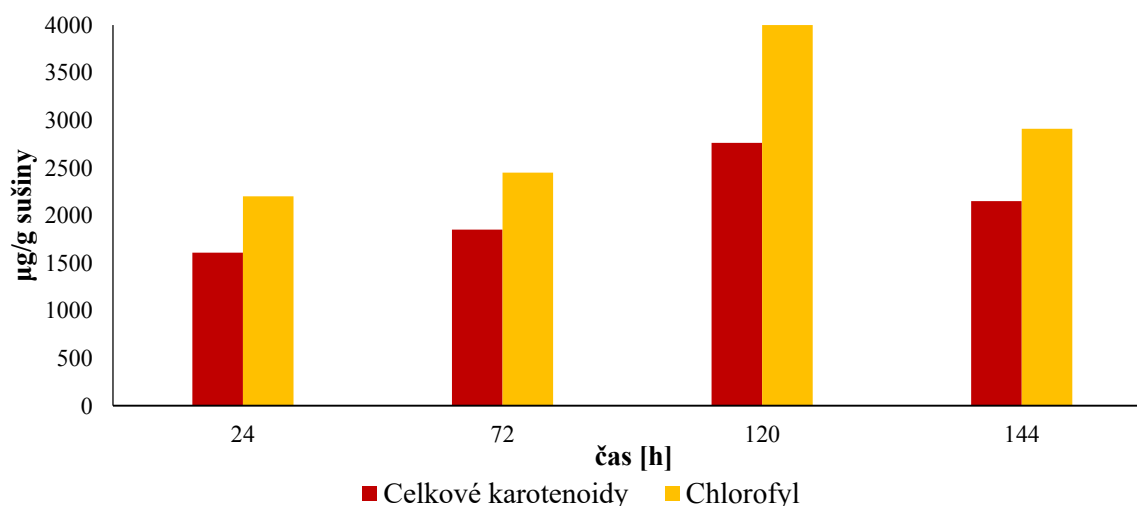


Graf 13: Závislost produkce proteinů na čase – *Chlamydomonas*

Koncentrace proteinů u *Chlamydomonas reinhardtii* dosahuje maxima pátý den kultivace, kde nabývá hodnoty 58,4 mg/g sušiny (*Graf 13*). Průběh produkce proteinů i většiny ostatních sledovaných metabolitů odpovídá růstové křivce.

5.5 Produkční charakteristika řasy *C. vulgaris*

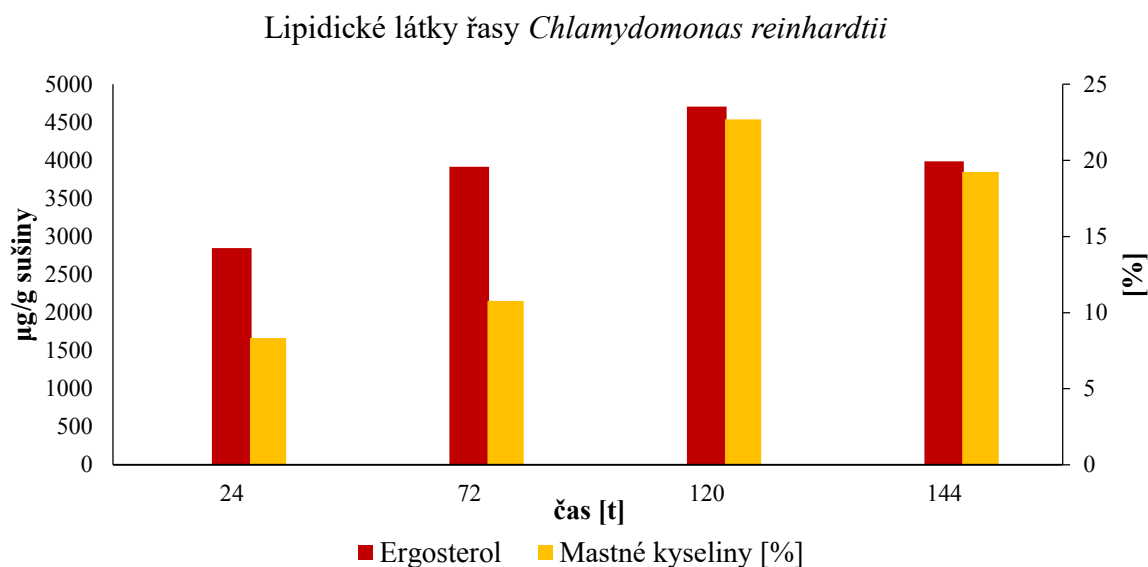
Metabolity řasy *Chlorella*



Graf 14: Závislost nárůstu metabolitů na čase – *C. vulgaris*

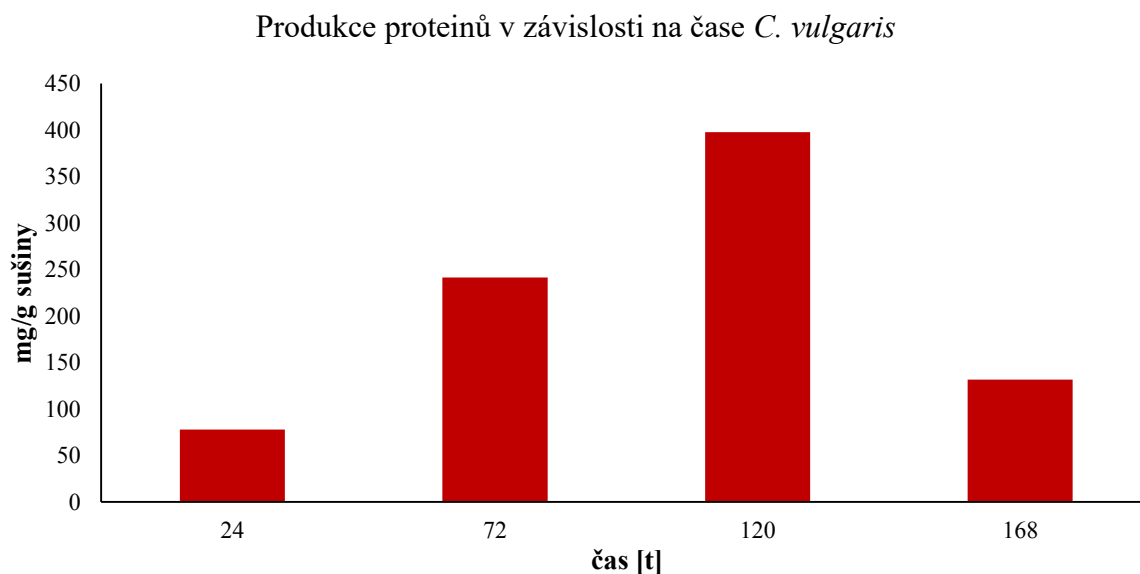
Produkce celkových karotenoidů a chlorofylu má obdobný trend růstu jako u předchozího kmene (*Graf 14*). Oba typy metabolitů vykazují maximum v 120. hodině kultivace. Množství

chlorofylu představuje 3 998,9 $\mu\text{g/g}$ sušiny. Koncentrace celkových karotenoidů je 2 761,6 $\mu\text{g/g}$ sušiny.



Graf 15: Nárůst lipidických látek v čase – *Chlamydomonas*

Maximální koncentrace 4 707,7 $\mu\text{g/g}$ sušiny ergosterolu je dosažena během 120. hodiny kultivace (Graf 15). U procentuálního zastoupení mastných kyselin je trend dosažení maxima stejný jako u ergosterolu. Největší možné množství mastných kyselin tvoří 22,7 %.



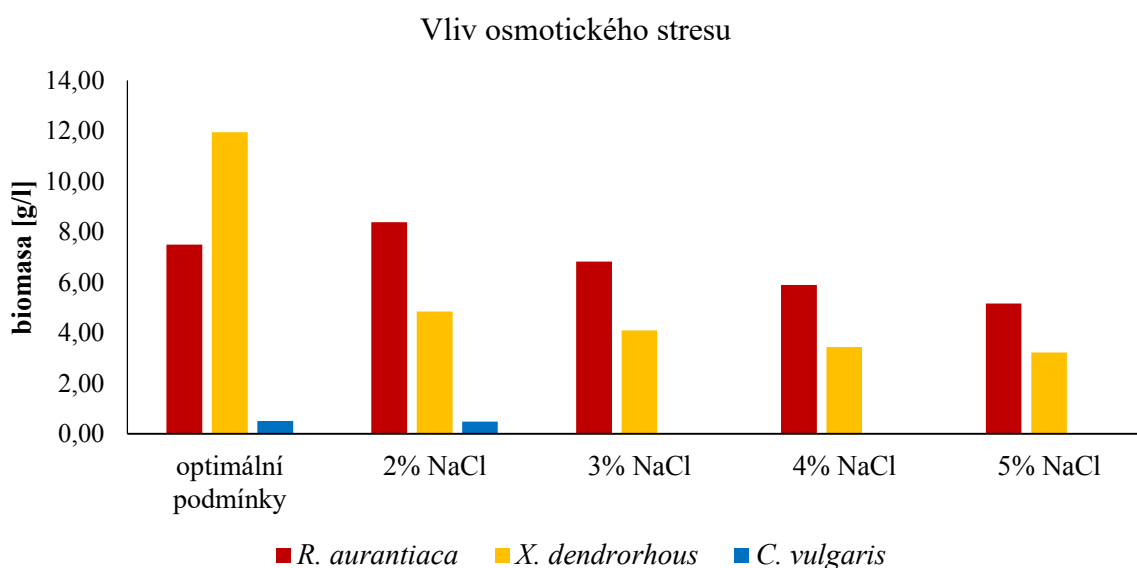
Graf 16: Nárůst proteinů v závislost na čase – *Chlorella*

Nárůst koncentrace proteinů u *Chlorella vulgaris* je velice výrazný. Tento trend je patrný z grafu 16. Nejvyšší množství bílkovin odpovídající 397,74 mg/g sušiny jsme zaznamenali pátý den kultivace. Poté obsah proteinů značně klesnul. Produkce proteinů výrazně kopíruje produkci biomasy (viz Graf 10).

5.6 Produkce biomasy a metabolitů v přítomnosti stresových faktorů

Všechny zmíněné stresy byly prováděny u všech čtyř vybraných mikroorganismů *Rhodotorula aurantiaca*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella vulgaris*. Pro kmen *C. vulgaris* byl stres zářením a též osmotický stres způsobený 3%, 4% a 5% roztokem NaCl a teplotní stres letální. U *C. reinhardtii* byly buňky usmrceny všemi koncentracemi chloridu sodného a teplotním stresem, proto nejsou tyto výsledky zaznamenány v grafech.

5.6.1 Vliv stresů na produkci biomasy



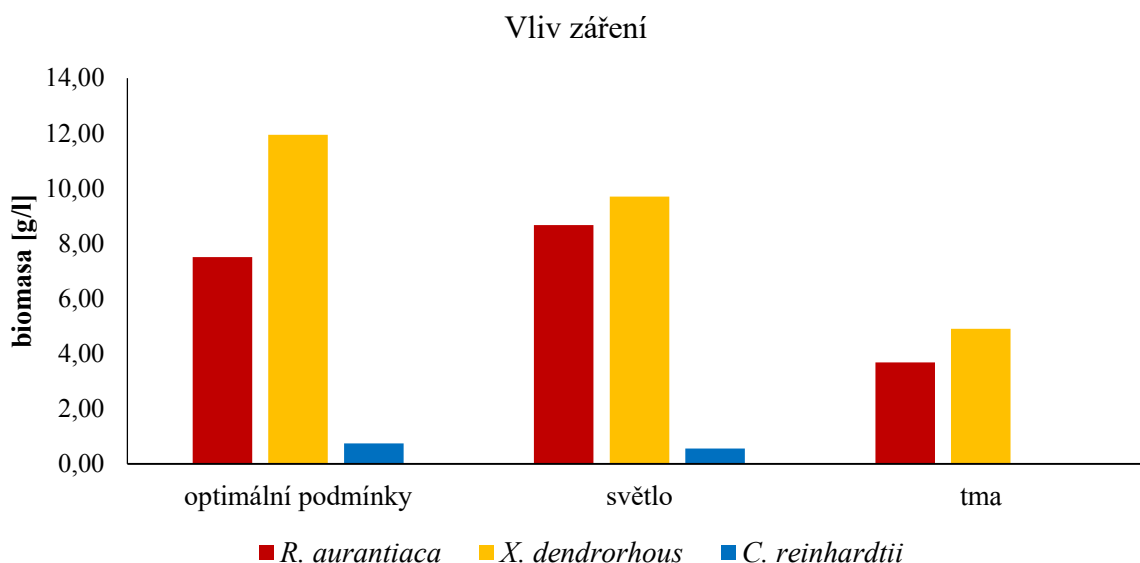
Graf 17: Vliv osmotického stresu na vybrané mikroorganismy

Vysoká koncentrace chloridu sodného přidaného do média vytváří hypertonické prostředí, které způsobuje odsávání vody z buňky. Při dlouhodobém působení dochází k jejímu smršťování až k prasknutí. [36]

Z grafu 17 je patrné, že osmotický stres má převážně inhibiční vliv na produkci biomasy. Čím je koncentrace roztoku chloridu sodného vyšší, tím je množství biomasy nižší.

Oproti optimálním podmínkám pro růst dochází u *Rhodotorula aurantiaca* k mírnému nárůstu biomasy při použití 2% roztoku NaCl. U dalších koncentrací je nárůst biomasy nižší. *Xanthophyllomyces dendrorhous* má více než o polovinu nižší výtěžky při použití různých koncentrací roztoku chloridu sodného.

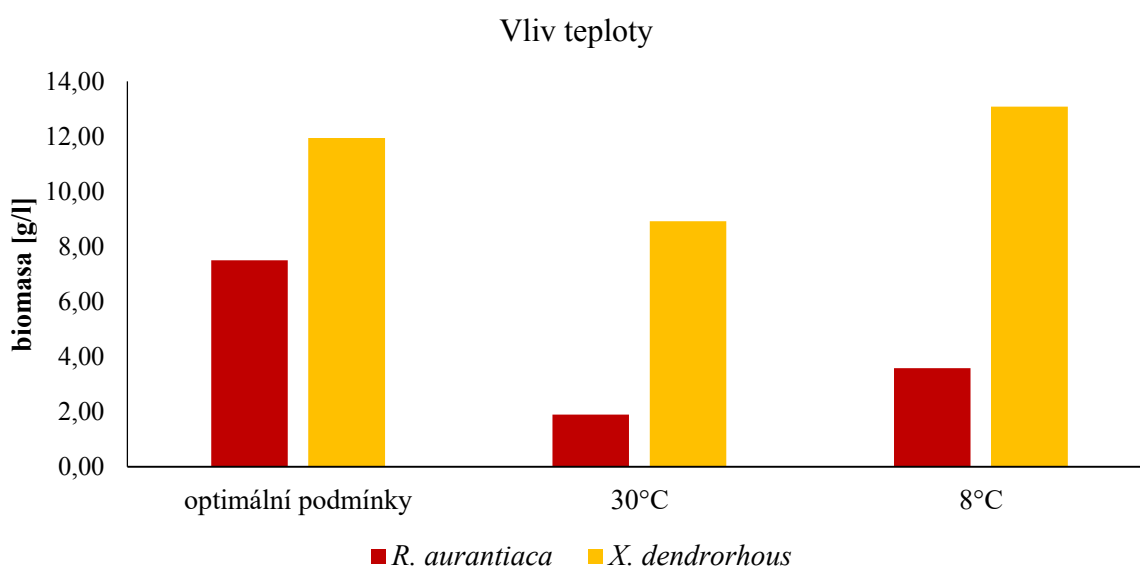
Chlorella vulgaris byla schopna akceptovat 2% roztok NaCl. Vyšší koncentrace měly letální účinek.



Graf 18: Vliv intenzivního záření a tmy na vybrané mikroorganismy

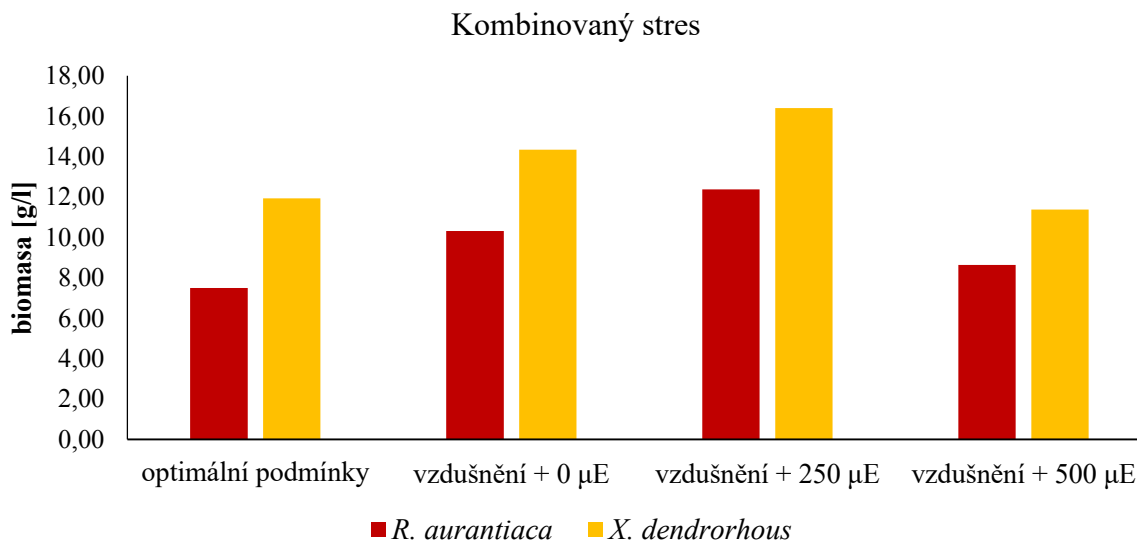
U kvasinky *X. dendrorhous* můžeme sledovat nižší výtěžnost biomasy při použití extrémních podmínek (Graf 18). Při použití intenzivního záření není pokles růstu biomasy tak výrazný, zatímco bez přístupu světla se množství biomasy snížilo více než o polovinu. U *R. aurantiaca* aplikace intenzivního záření naopak růst biomasy podpořila. Při absenci záření stejně jako u *X. dendrorhous* množství biomasy kleslo na polovinu.

Vliv záření na životaschopnost řas je klíčový. Optimum má velmi úzké rozpětí, z čehož vyplývá, že nedostatek ale také nadbytek světla může mít fatální důsledky. Toto tvrzení nám potvrzují i hodnoty v grafu 18, kde vidíme pouze nižší množství biomasy při intenzivním osvětlení *C. reinhardtii*. Ostatní výše zmíněné stresy spojené se zářením působily na *C. vulgaris* a *C. reinhardtii* letálně.



Graf 19: Vliv různých teplot na produkci biomasy

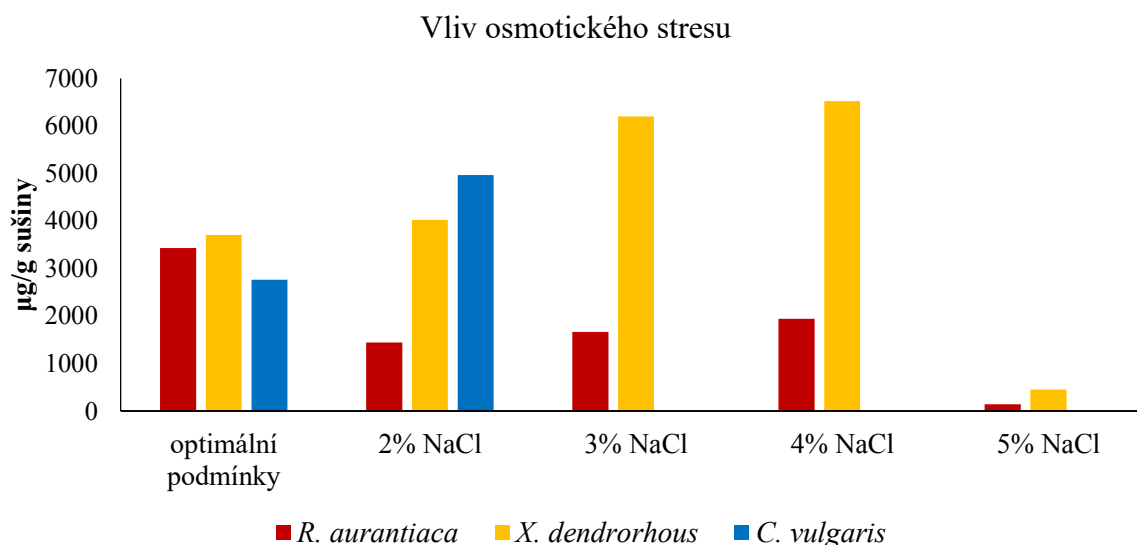
U kvasinky *R. aurantiaca* měla aplikace teplotních stresů inhibiční účinky (viz *Graf 19*). Při 30 °C byla koncentrace biomasy pouze 1,9 g/, při 8 °C množství dosáhlo hranici 3,6 g/l. Kultivace *X. dendrorhous* při 30 °C zpomalila růst biomasy, jejíž množství bylo 8,9 g/l. Naopak při 8 °C došlo k mírnému podpoření produkce biomasy, která narostla na 13,08 g/l. Při odchýlení od teplotního optima při kultivaci řas vedlo k jejich usmrcení.



Graf 20: Kombinovaný stres vzdušněním a zářením na produkci biomasy

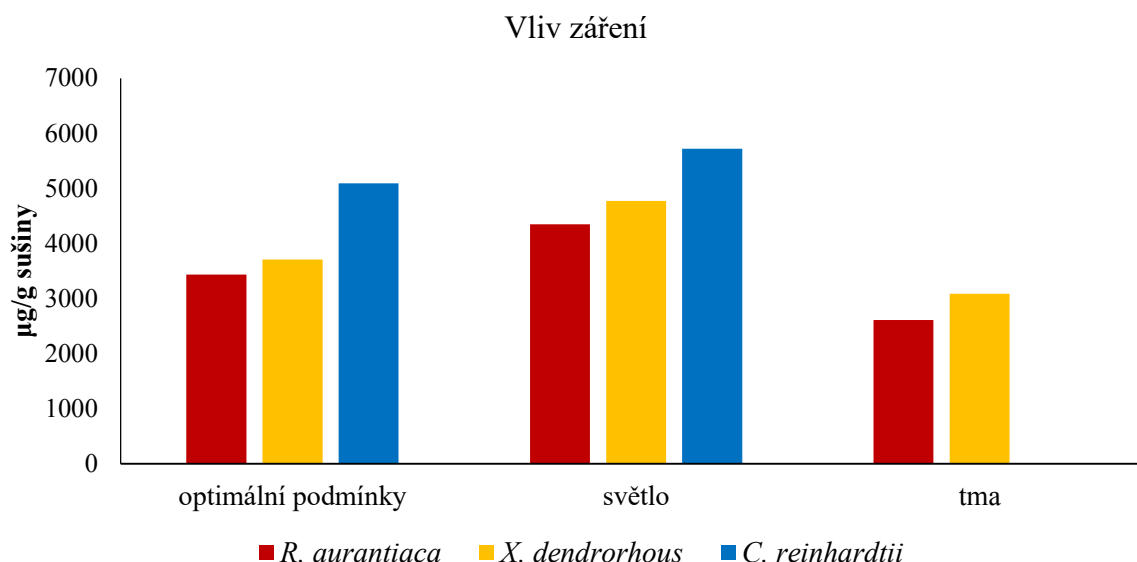
Z grafu 20 je patrné, že použití vzdušnění (300 ml/min) při laboratorní teplotě má pozitivní vliv na produkci biomasy u obou kvasinek. Kombinace vzdušnění s použitím záření o intenzitě 250 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ je jednoznačně nejvýhodnější. Oproti optimálním podmínkám dochází k nárůstu biomasy u *X. dendrorhous* o 37 % a u *R. aurantiaca* dokonce o 65 %. Použití záření s intenzitou 500 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ je již pro *X. dendrorhous* mírně inhibiční.

5.6.2 Vliv stresů na produkci karotenoidů



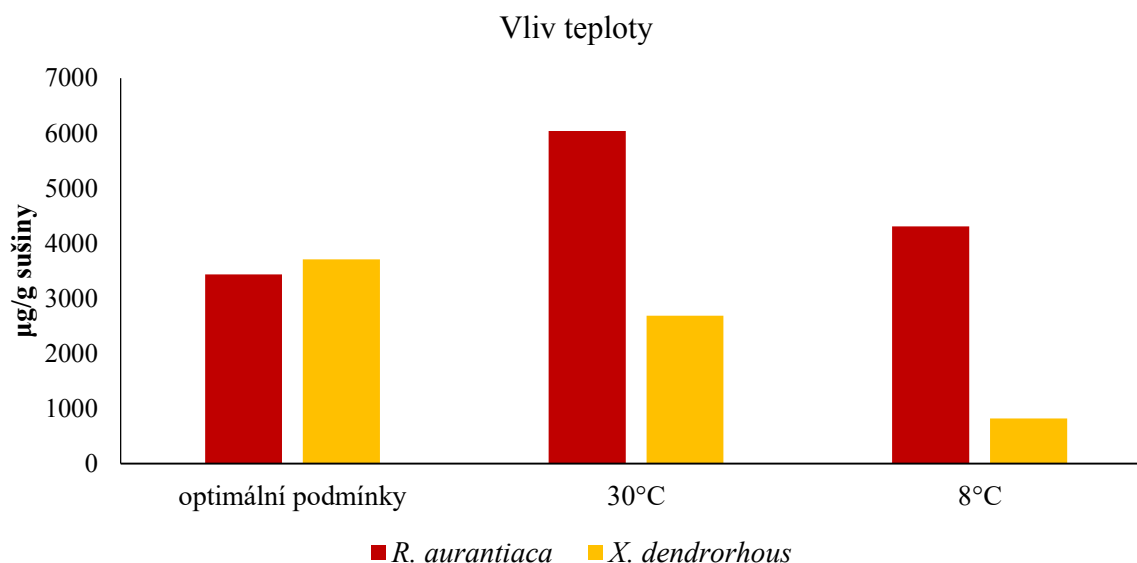
Graf 21: Vliv osmotického stresu na celkové karotenoidy

Z grafu 21 je u *X. dendrorhous* a *C. vulgaris* patrné, že roztok chloridu sodného působí podpůrně do koncentrace 4 %. Při koncentraci 5 % NaCl byly účinky jasně inhibiční. Tento trend neodpovídá růstu biomasy, kdy množství biomasy od 2% roztoku NaCl úměrně klesá. Buňky *X. dendrorhous* se pravděpodobně snaží syntetizovat karotenoidy jako možnou ochranu proti stresu, kterému jsou vystaveny, protože osmotický stres velice negativně působí na růst biomasy (Graf 17).



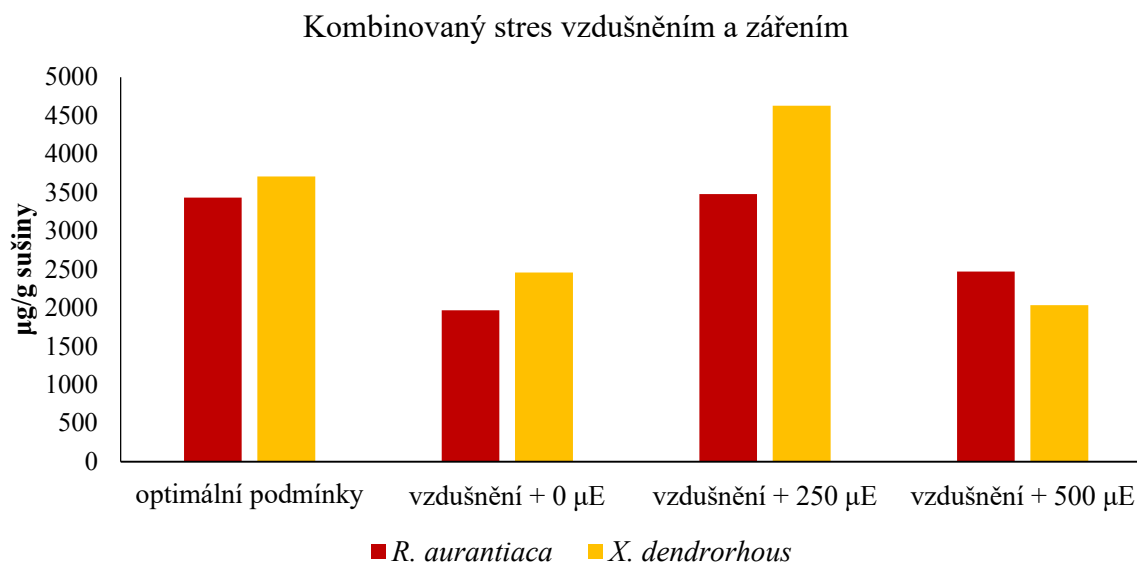
Graf 22: Vliv záření na produkci celkových karotenoidů

Karotenoidní látky mají fotoprotektivní účinky [37]. Tuto tezi nám potvrzují i naměřené výsledky. Z grafu 22 je patrné, že při intenzivním záření je produkce u *R. aurantiaca*, *X. dendrorhous* i *Chlamydomonas reinhardtii* těchto ochranných látek zvýšená. Naopak při absenci záření je tvorba karotenoidů snížena. Tento stres byl taktéž aplikován na *Chlorella vulgaris*, pro kterou byly upravené podmínky letální, avšak při snaze přežít je množství karotenoidů na množství biomasy nejvyšší.



Graf 23: Vliv teploty na produkci celkových karotenoidů

Zvýšení i snížení teploty od teplotního optima růstu *R. aurantiaca* podpořil produkci karotenoidů. U *X. dendrorhous* měla kultivace při teplotě 30 °C i 8 °C inhibiční účinky. Ve srovnání s nárůstem biomasy má produkce karotenoidů přesně opačnou tendenci.

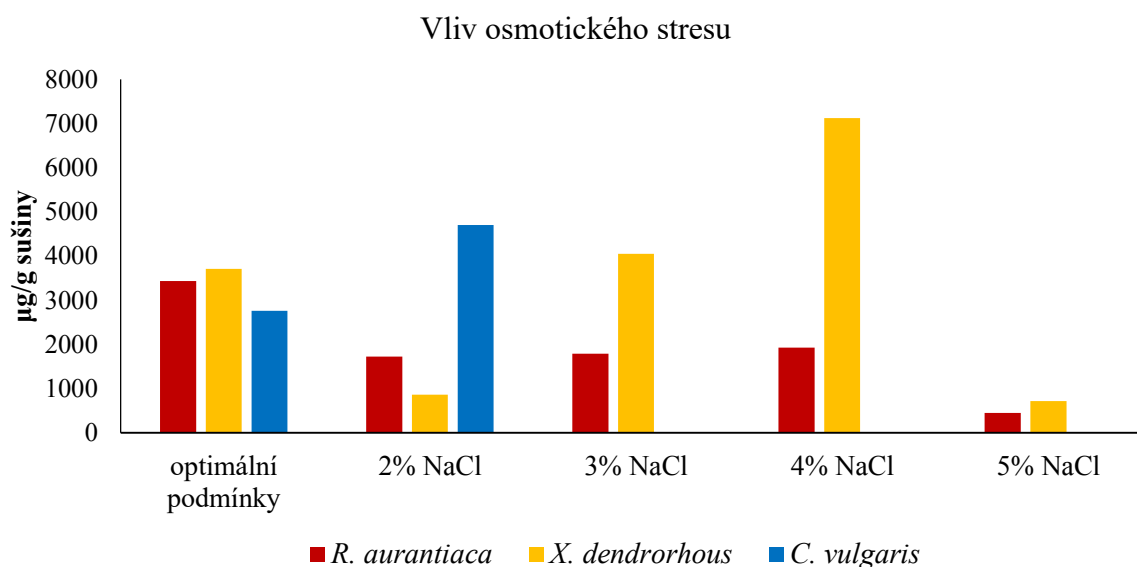


Graf 24: Vliv kombinovaného stresu vzdušnění a záření na produkci karotenoidních látek

Absence záření, ale také příliš intenzivní osvětlení v kombinaci s kyslíkem vyvolává inhibici produkce karotenoidů. Vhodná kombinace pro podporu produkce karotenoidů je vzdušnění s intenzitou záření $250 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Produkce biomasy vykazuje obdobný trend.

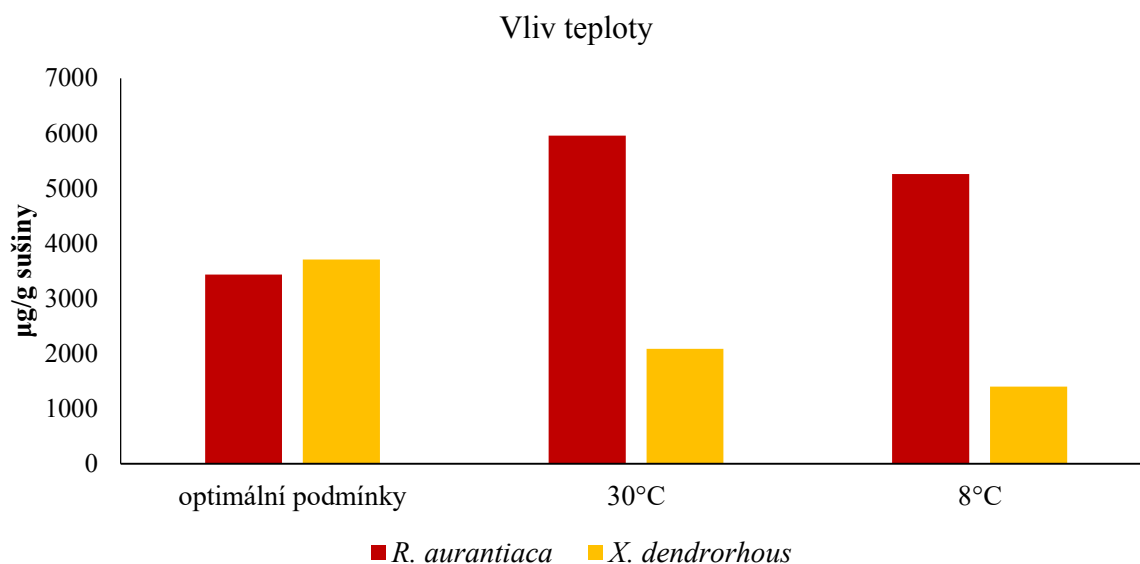
Z uvedených výsledků je patrné, že karotenoidy jsou produkovány ve zvýšené míře u většiny použitých stresových faktorů, vykazují tedy zřejmě zkříženou odezvu a jsou zapojeny v celkové stresové odpovědi zejména u kvasinek.

5.6.3 Vliv stresů na produkci ergosterolu



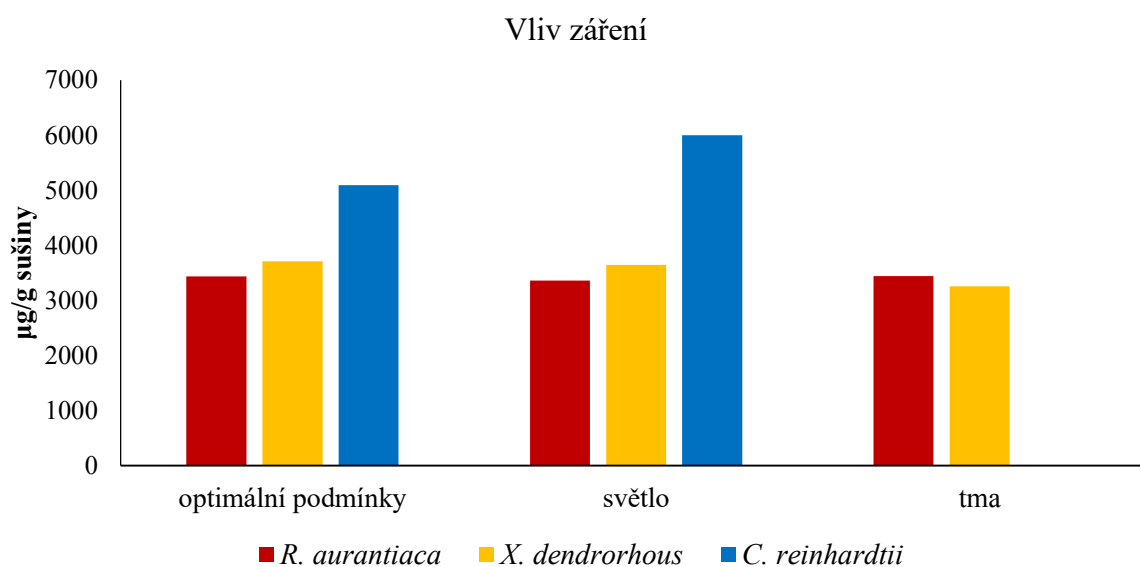
Graf 25: Vliv osmotického stresu na produkci ergosterolu

Ergosterol se vyskytuje v membráně buněk, kde ovlivňuje její fluiditu a tím omezeně i propustnost [38]. U *R. aurantiaca* je produkce ergosterolu oproti optimálním podmínkám celkově nižší. *X. dendrorhous* produkuje při 3% a 4% roztoku NaCl vzhledem k optimu více ergosterolu. Při 2% a 5% koncentraci NaCl je tvorba ergosterolu inhibovaná. U *C. vulgaris* 2% roztok chloridu sodného podporuje výtěžnost výše uvedeného metabolitu. Při vyšších koncentracích došlo k usmrcení buněk, stejně tak u *C. reinhardtii*.



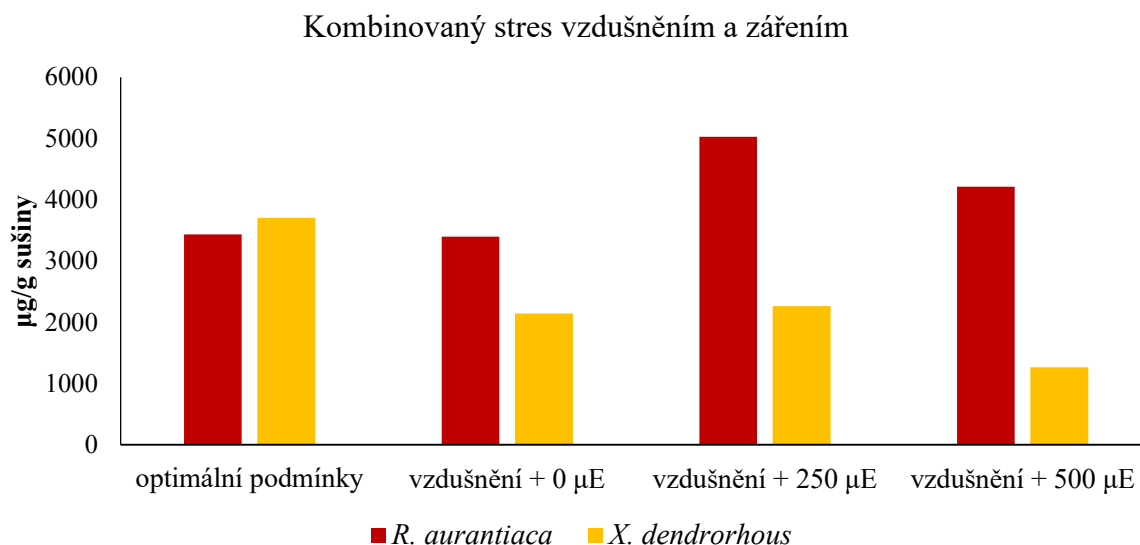
Graf 26: Vliv teploty na produkci ergosterolu

Trend produkce ergosterolu je pod vlivem změn teplot u *R. aurantiaca* a *X. dendrorhous* opačný. Zatímco u *R. aurantiaca* je výtěžnost ergosterolu vyšší při zvýšení i snížení teploty, u *X. dendrorhous* je jeho produkce nižší. Tato tendence může být způsobena rozdílným složením buněčné stěny a plazmatické membrány. Při změnách teploty pravděpodobně také dochází ke změnám rigidity membrány, čímž se množství ergosterolu akumuluje různě.



Graf 27: Vliv záření na produkci ergosterolu

Vliv záření na produkci ergosterolu u analyzovaných mikroorganismů je téměř zanedbatelný. Pouze u *C. reinhardtii* můžeme sledovat mírné navýšení tvorby ergosterolu, a to nejspíše z důvodu protekce buňky před vysokým osvětlením.

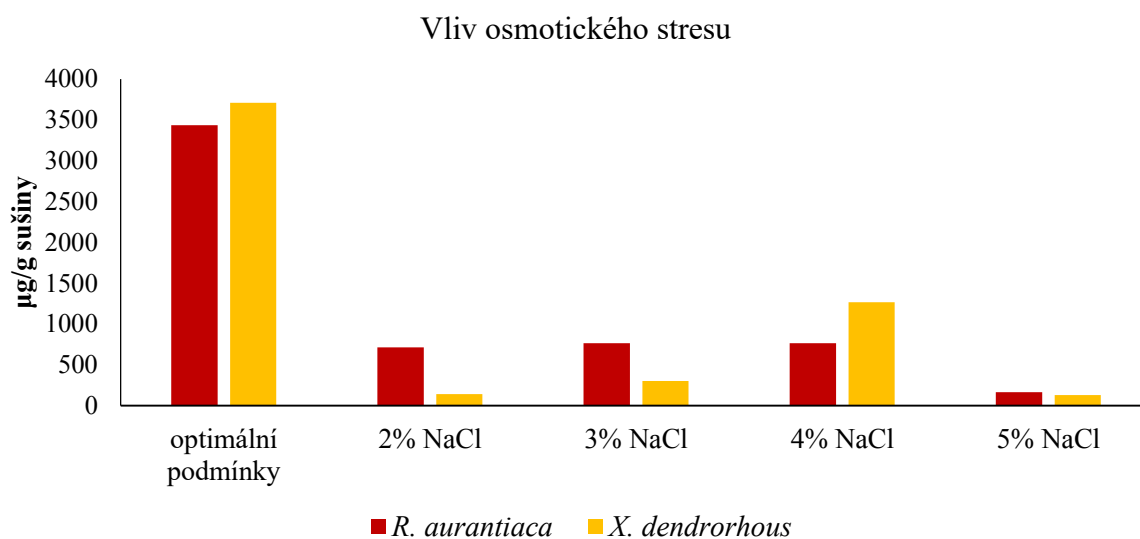


Graf 28: Vliv kombinovaného stresu vzdušněním a zářením na produkci ergosterolu

U *R. aurantiaca* sledujeme stejný charakter nadprodukce ergosterolu jako při nárůstu biomasy. Maxima dosahuje v kombinaci vzdušnění se zářením o intenzitě $250 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. U *X. dendrorhous* nedochází k nadměrné tvorbě ergosterolu u žádné z kombinací stresových faktorů (Graf 28).

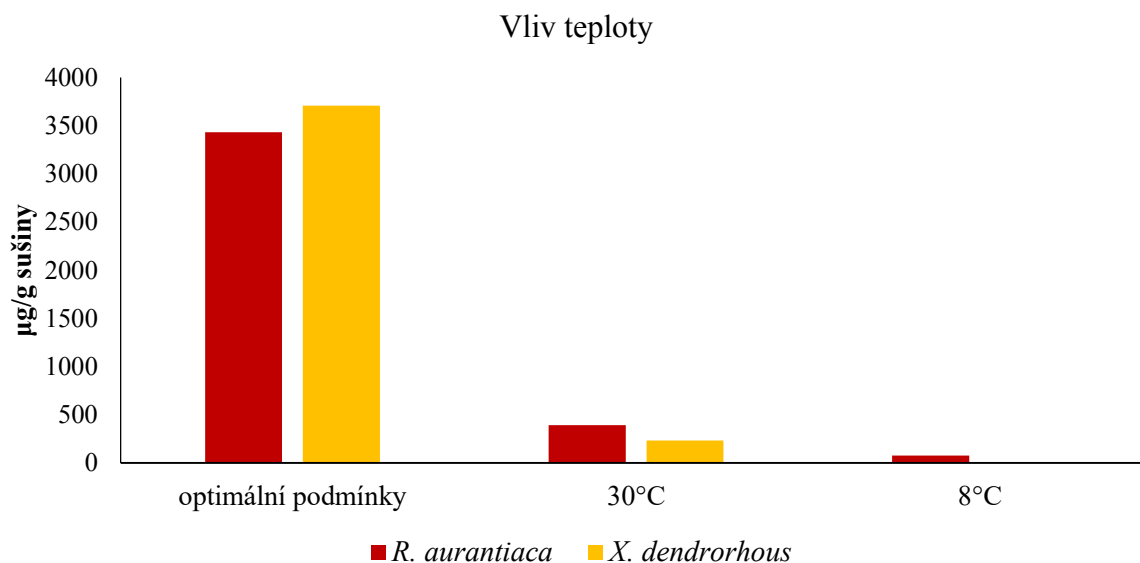
5.6.4 Vliv stresů na produkci ubichinonu

Při aplikaci fyzikálních stresů dochází u všech metabolitů k výrazně podprůměrné produkci (Graf 29-32). U *R. aurantiaca* je množství ubichinonu průměrně 4x nižší než při kultivaci za normálních podmínek. Při kultivaci *X. dendrorhous* je snížení tvorby tohoto metabolitu ještě znatelnější.



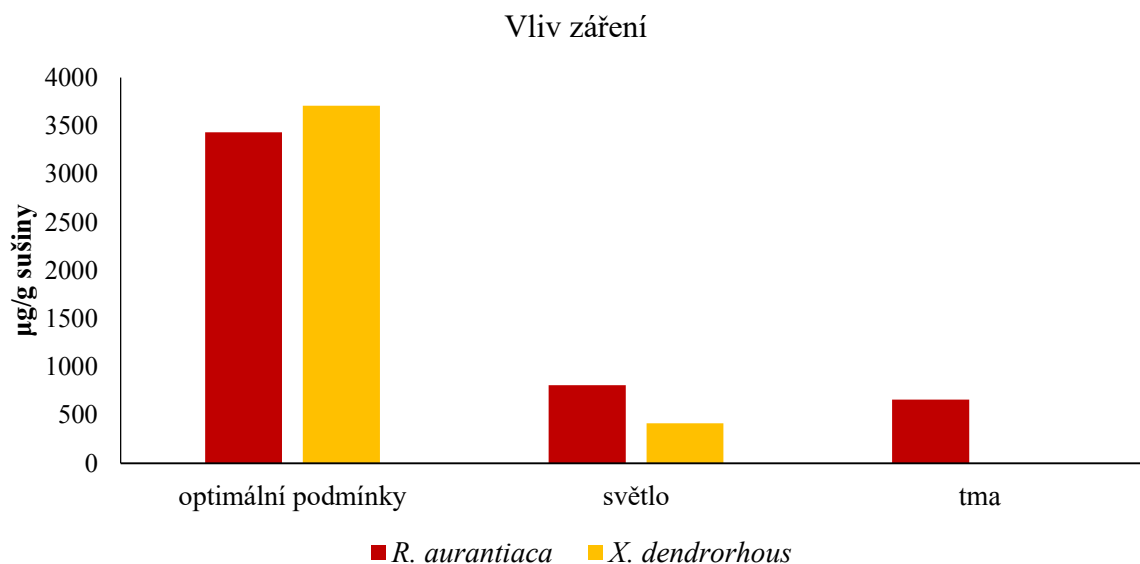
Graf 29: Vliv osmotického stresu na produkci ubichinonu

Jako u všech použitých stresů, také u osmotického je produkce ubiquinonu značně nižší oproti optimálním podmínkám pro růst. U *X. dendrorhous* můžeme pozorovat mírný nárůst množství u 4% roztoku NaCl oproti ostatním použitým koncentracím. V grafu 29 je u *R. aurantiaca* patrný ještě výraznější inhibiční účinek při použití 5% roztoku NaCl.



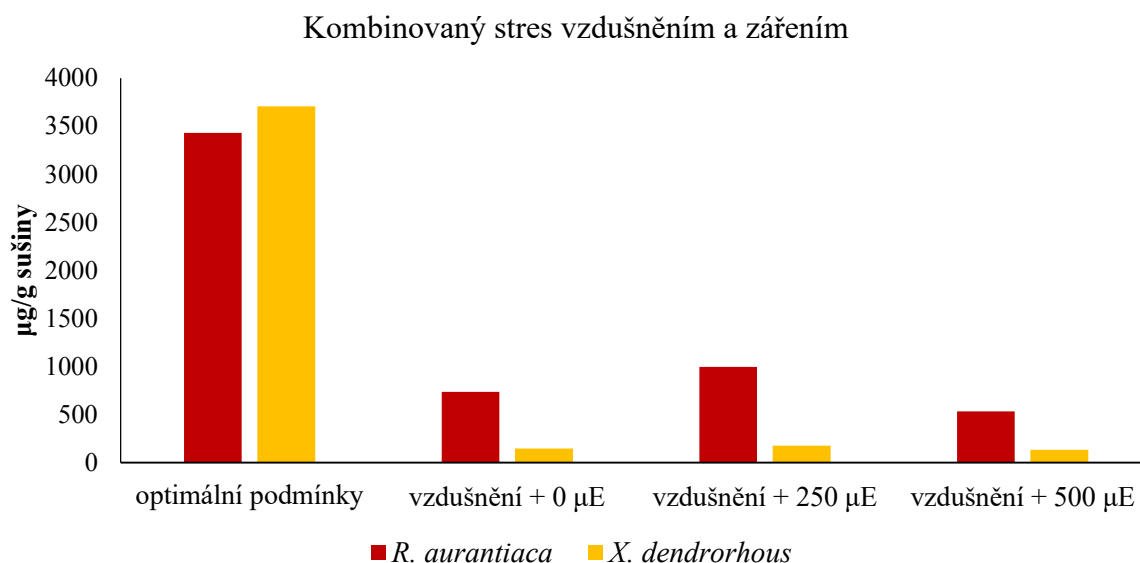
Graf 30: Vliv teploty na produkci ubiquinonu

Množství ubiquinonu kvasinky *Xanthophyllomyces dendrorhous* při 8 °C je pouze 3,9 µg/g sušiny, což je v grafu 30 téměř nepozorovatelné.



Graf 31: Vliv záření na produkci ubiquinonu

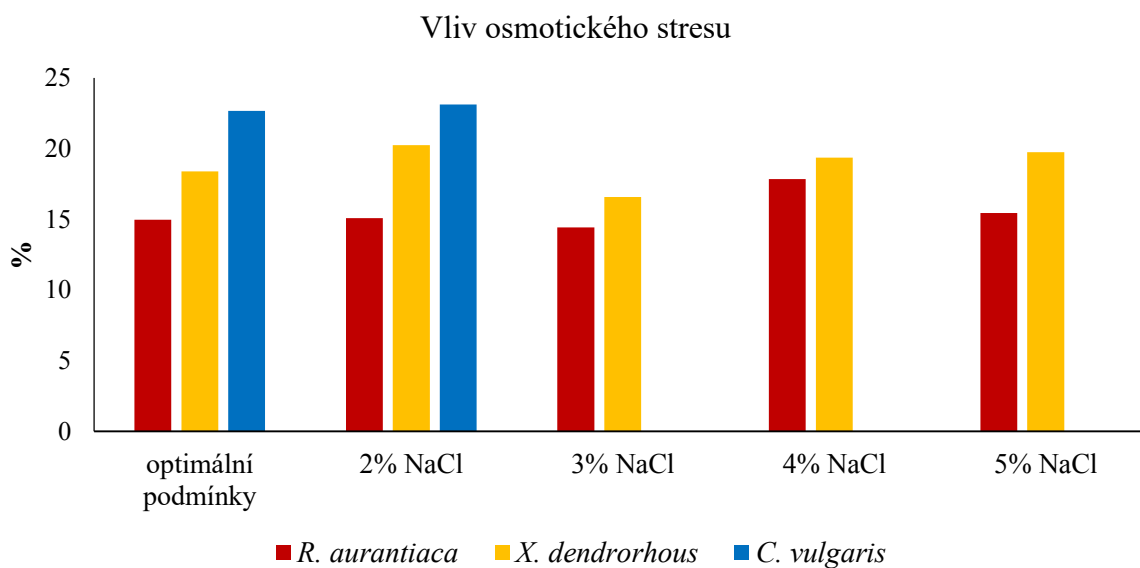
Podprodukce ubiquinonu je výraznější u *Xanthophyllomyces* než u *R. aurantiaca*. O tom vypovídá i analyzované množství ubiquinonu *X. dendrorhous* kultivované ve tmě, které se nachází pod mezí detekce.



Graf 32: Vliv kombinovaného stresu vzdušněním a zářením na ubiquinon

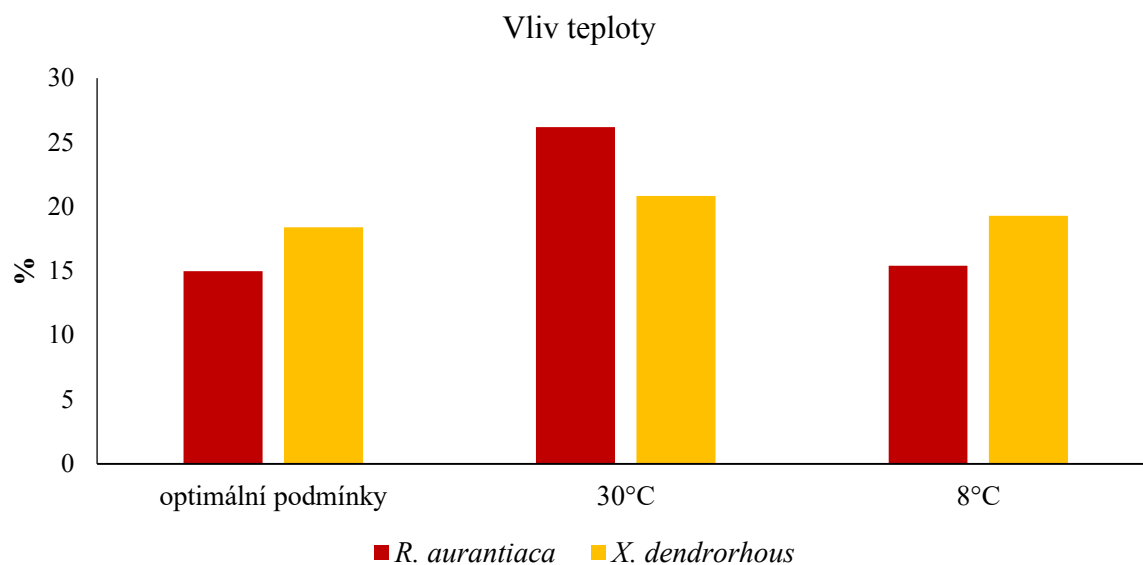
Při kombinovaném stresu je produkce ubiquinonu u *X. dendrorhous* značně snížena a výrazněji se neliší. U *R. aurantiaca* je podprodukce také znatelná.

5.6.5 Vliv stresů na produkci mastných kyselin



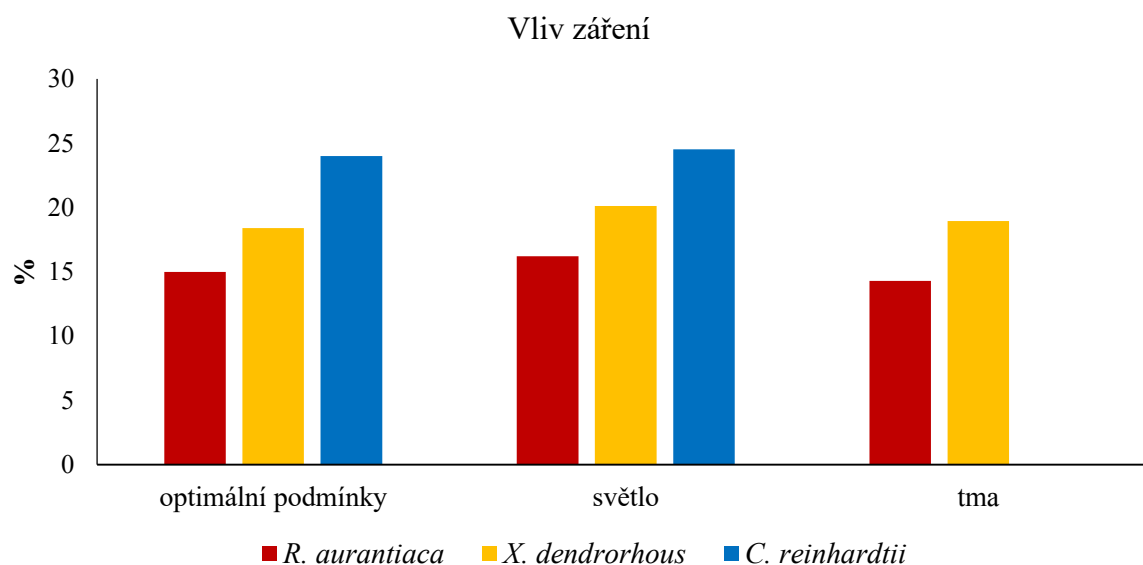
Graf 33: Vliv osmotického stresu na mastné kyseliny

Osmotický stres nemá na produkci mastných kyselin téměř žádný vliv (Graf 33), což naprosto nekoresponduje s růstem biomasy. U *R. aurantiaca* se koncentrace pohybuje v rozmezí 14 až 18 % a u *X. dendrorhous* 18 až 20 %.



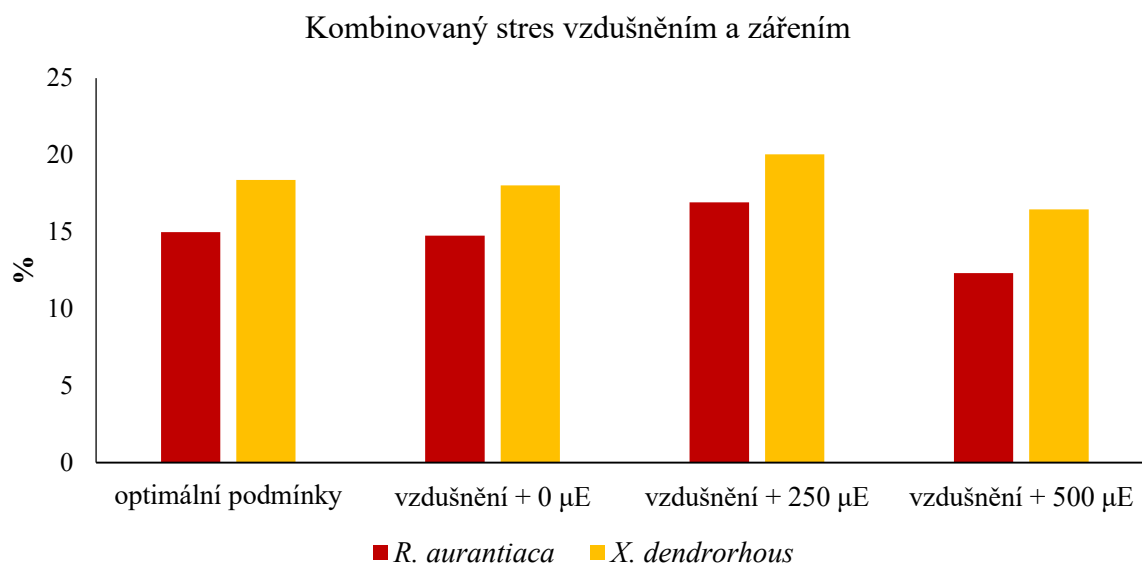
Graf 34: Vliv teploty na produkci mastných kyselin

U obou teplot vidíme nárůst produkce mastných kyselin. U *R. aurantiaca* je nárůst množství mastných kyselin při 30 °C mnohem výraznější než u *X. dendrorhous*. Při 8 °C se procentuální obsah téměř neliší.



Graf 35: Vliv záření na mastné kyseliny

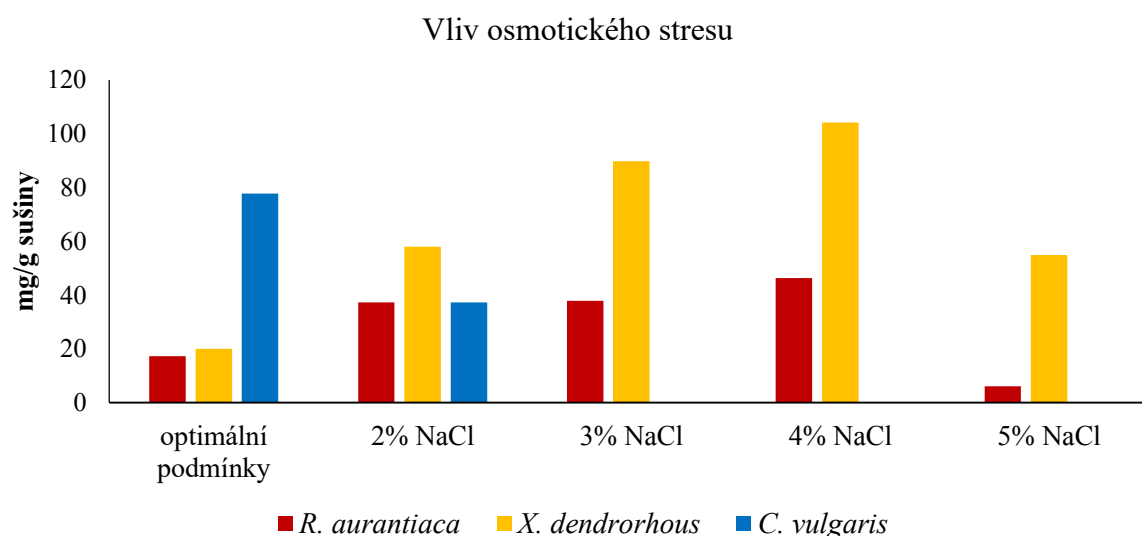
Při intenzivním záření nedochází k žádným velkým změnám při produkci mastných kyselin a taktéž ani při kultivaci ve tmě.



Graf 36: Vliv kombinovaného stresu vzdušněním a zářením na mastné kyseliny

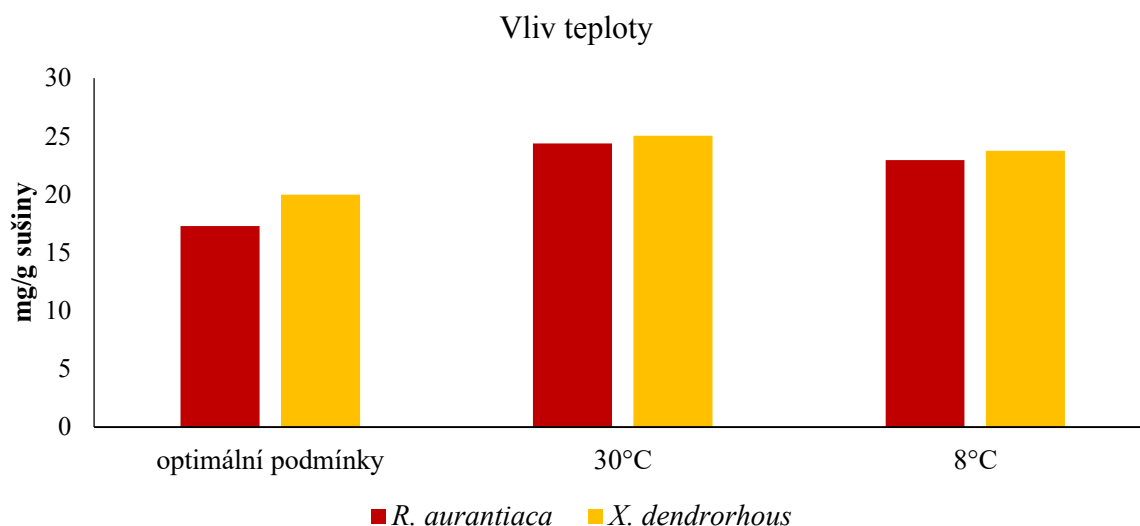
Nárůst mastných kyselin má obdobný charakter jako produkce biomasy, avšak nárůst není tak výrazný. Kombinace kyslíku a intenzivního záření opět působí inhibičně.

5.6.6 Vliv stresů na produkci celkových proteinů



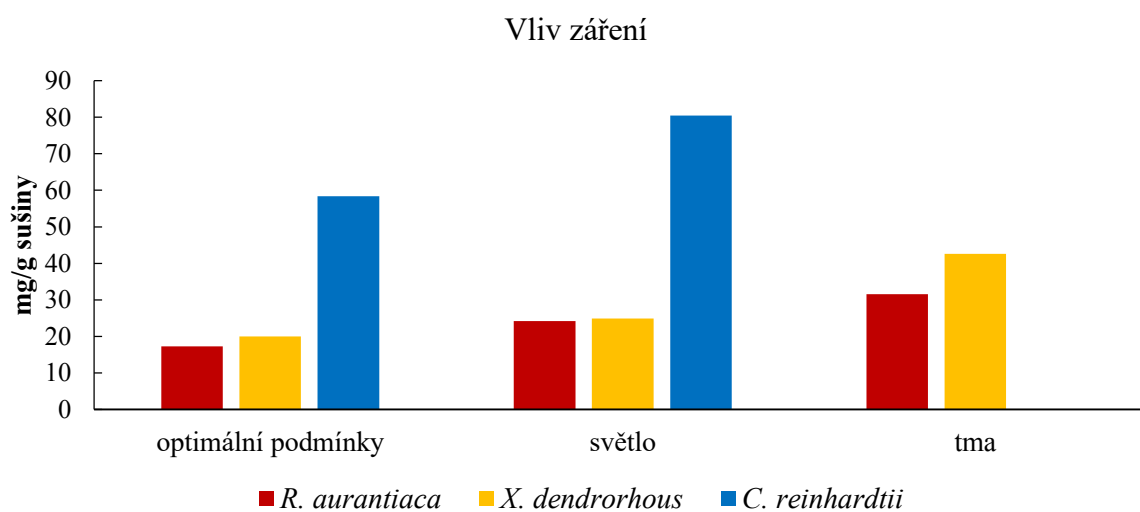
Graf 37: Vliv osmotického stresu na produkci celkových proteinů

Zatímco u *C. vulgaris* působí použití solného roztok inhibičně, u kvasinky *X. dendrorhous* produkci proteinů podporuje. Maximálního množství dosahuje při 4% NaCl. Při vyšší koncentraci již dochází ke snížení tvorby. *R. aurantiaca* vykazuje nadprůměrnou produkci bílkovin v koncentračním rozpětí 2 % až 4 %. Při kultivaci s 5% roztokem NaCl je množství proteinů více než o polovinu nižší. Je pravděpodobné, že při určitých koncentracích stresových faktorů jsou produkovány specifické stresové proteiny pravděpodobně typu HSP („heat shock proteins“).



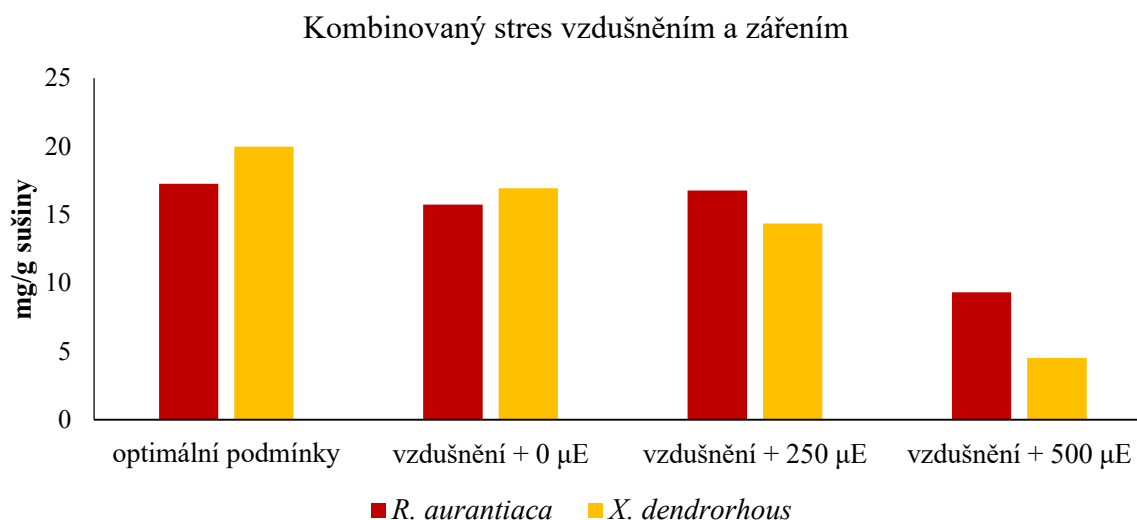
Graf 38: Vliv teploty na celkové proteiny

Při odchýlení od teplotního optima růstu mikroorganismů nastává teplotní šok a dochází opět k tvorbě HSP proteinů, což se projevuje jako zvýšení množství celkových proteinů [28]. Tuto tendenci můžeme pozorovat v grafu 38, kde je množství celkových proteinů vyšší při kultivaci v 8°C a 30°C než u kultivace za optimálních podmínek.



Graf 39: Vliv záření na produkci celkových proteinů

C. reinhardtii vykazuje nárůst množství proteinů při použití intenzivního záření. U kvasinek se koncentrace proteinů při intenzivním osvětlení téměř nezměnila, zatímco ve tmě byl nárůst výraznější.



Graf 40: Vliv kombinovaného stresu vzdušením a zářením na celkové proteiny

Vliv kyslíku a různých intenzit záření má na obě kvasinky inhibiční účinky při produkci proteinů (Graf 40). Nejvýraznější snížení tvorby bílkovin je v kombinaci vzdušnění s intenzitou záření $500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ u obou analyzovaných kvasinek. Při posledním zmíněném stresu rovněž docházelo k nízké produkci biomasy, což dokazuje, že zvolený stres je na mikrobiální kulturu příliš silný.

5.7 Kokultivace

Při pokusech s kokultivacemi nebyl nalezen optimální poměr očkovaných mikroorganismů. Varianty kultivací (viz kapitola 4.4.3) končily předčasným usmrcením buněk řas i kvasinek. Možnosti kokultivací budou předmětem dalšího výzkumu.

6 ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo srovnání růstu a produktivity autotrofních řas a karotenogenních kvasinek za účelem posouzení jejich biotechnologického využití. Vybranými kmeny byly kvasinky *Rhodotorula aurantiaca* a *Xanthophyllomyces dendrorhous* a z řas *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella vulgaris*. Množství biomasy a sledované metabolity byly srovnávány při kultivacích s různými fyzikálními stresy (teplotní stres, stres osvětlením, osmotický stres a kombinovaný stres vzdušením s různou intenzitou záření). Sledovanými metabolity byly celkové karotenoidy, ergosterol, ubichinon, mastné kyseliny a bílkoviny.

V experimentální části byly stanoveny růstové křivky pro všechny výše zmíněné mikroorganismy. Obě kvasinky vykazovaly charakter diauxie, přičemž druhého maxima v exponenciální fázi růstu dosáhly během 90. hodiny kultivace na glukózovém médiu bez vlivu fyzikálních stresů. Řasy byly kultivovány na médiu BBM. *C. reinhardtii* přešla do stacionární fáze po 90. hodině kultivace. *C. vulgaris* dosáhla maxima exponenciálního růstu ve 127. hodině kultivace.

Při testování možností kokultivací nebyl nalezen vhodný poměr pro očkování vybraných kultur, proto bude toto téma zařazeno jako předmět dalších studií.

V rámci testování fyzikálních stresů, které byly aplikovány na kvasinky i řasy, byly použity vysoké i nízké teploty (8 °C a 30 °C), intenzivní osvětlení a absence záření. Pro navození osmotického stresu byl aplikován 2%, 3%, 4% a 5% roztok chloridu sodného. Následně byl vyzkoušen vliv kombinovaného stresu vzdušením spojeným s různými intenzitami záření ($0 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $250 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $500 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Největší nárůst biomasy oproti kultivaci při normálních podmínkách byl u obou kvasinek pozorován při kombinovaném stresu s intenzitou záření $250 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Jednoznačný negativní vliv na růst biomasy a také produkci veškerých metabolitů, kromě mastných kyselin, měl 5% roztok NaCl.

Výrazná nadprodukce celkových karotenoidů byla pozorována při 30 °C u *R. aurantiaca* a při 3% a 4% roztoku NaCl u *X. dendrorhous*. Stejně stresové podmínky způsobily vyšší výtěžnost také u ergosterolu. Aplikace veškerých stresových faktorů působí na ubichinon značně inhibičně. U mastných kyselin nebyly zaznamenány žádné výrazné výkyvy produkce v souvislosti se změnami fyzikálních podmínek. Zvýšení tvorby proteinů u obou kvasinek je značné při použití 2%, 3% a 4% solného roztoku. Ze získaných výsledků je zřejmé, že sledované metabolity mají různou, avšak nezanedbatelnou roli v celkové stresové odezvě kvasinek.

Změny množství biomasy a produkce metabolitů u řas je možné konstatovat pouze u stresu způsobeného 2% roztokem NaCl u *Chlorella vulgaris*, kde dochází k podpoře produkce všech metabolitů, a vlivu intenzivního záření u *Chlamydomonas reinhardtii*, kde taktéž dochází k nárůstu množství produkovaných látek. Ostatní použité fyzikální faktory byly příliš drastické a na řasy působily letálně. Z tohoto důvodu není možné adekvátně srovnat jejich produktivitu s kvasinkami. Studium vlivu mírnějších stresových podmínek je vhodným námětem pro navazující výzkumy.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SATYANARAYANA, T. a Gotthard. KUNZE. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. New York: Springer, 2009. ISBN 9781402082924.
- [2] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990, 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [3] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky*. 1. vyd. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1957, 344 s.
- [4] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [5] ŠILHÁNOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002, 364 s. ISBN 80-200-1024-6
- [6] KURTZMAN, C., J. W. FELL a T. BOEKHOUT (eds.). *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, xviii, 1055 p. ISBN 04-448-1312-8.
- [7] FRENGOVA, G. I., BESHKOVA, D. M. *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 36, no. 2, p. 163-180.
- [8] WOZNIAK, A. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Res.* 2011, **11**(3), 252-262. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00711.x>.
- [9] *Rhodotorula*. *Microbe devision (JCM)* [online]. Japan, 2017 [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: http://www.jcm.riken.go.jp/cgi-bin/jcm/jcm_kojin?ANY=rhodotorula
- [10] *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbe devision (JCM)* [online]. Japan, 2017 [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_keyword?AN=Xanthophyllomyces&BN=dendrorhous
- [11] BARSANTI, L. a P.. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. 2nd ed. Boca Raton, [Florida]: CRC Press/Taylor, 2014.
- [12] KALINA, T. a J. VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a jiné podobné organismy v současné biologii*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 606 s. ISBN 978-80-246-1036-8.
- [13] SAHOO, D. a J. SECKBACH. *The Algae World*. London: Springer, 2015. ISBN 978-94-017-7320-1.
- [14] URBAN Z. a T. KALINA. *Sinice, řasy, houby: Systém a vývoj*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976, 253 s.
- [15] GOODWIN, T. W. *The Biochemistry of the Carotenoids*. 2nd ed., London: Chapman and Hall, 1980, ISBN 978-94-009-5862-3.

- [16] TAKAICHI, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*. 2011, 9(12), 1101-1118. DOI: 10.3390/md9061101. ISSN 1660-3397. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/9/6/1101/>
- [17] KARRER, P., JUCKER, E. *Carotenoids*. Zürich, 1951. 384 s.
- [18] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, 2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.
- [19] FRASER, P. D. a P. M. BRAMLEY. *The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids*. *Progress in Lipid Research*. 2004, 43(3), 228-265. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>.
- [20] MASÁK, J., PELECHOVÁ, J., PLACHÝ, J. *Speciální mikrobiální technologie*. Praha: VŠCHT Praha, 1. vyd., 1992, 301 s.
- [21] VOET, D. a J. G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9
- [22] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Brno: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [23] MATOUŠ, B. et. al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. 540 s. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [24] WEETE, J. D., Maritza A., M. BLACKWELL a G. BUTLER. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols. *PLOS ONE*. 2010, 5(5), DOI: 10.1371/journal.pone.0010899.
- [25] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [26] HOHMANN, S. a W. H. MAGER. *Yeast stress responses*. rev. ed. New York: Springer, 2003. ISBN 35-404-3926-9.
- [27] HÁRONIKOVÁ, A. *Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 141 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [28] Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 2004, 9(5), 244-252. DOI: doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006.
- [29] POOLE, C. F. a S. K. POOLE. *Chromatography today*. New York, NY, U.S.A.: Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1991. ISBN 04-448-8492-0.

- [30] POOLE, C. F. *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-385540-4.
- [31] SOMMER, L. *Základy analytické chemie*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [32] SWADESH, Joel. *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2001. Analytical chemistry series (CRC Press). ISBN 08-493-0003-7.
- [33] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [34] OPEKAR, F. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.
- [35] Multicultivátor MC 1000-OD. *Photon Systems Instruments* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <https://www.psi.cz/products/photobioreactors/multi-cultivator-mc-1000>.
- [36] ROSYPAL, S. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-718-3268-5.
- [37] GIESE, A. C. *Photophysiology: Current Topics*. 3. vyd. USA: Academic Press, 1968.
- [38] PARKS, L. W. a W. M. CASEY. Physiological implication of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Review of Microbiology*. 1995, **49**, 95-116. ISSN 00664227.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP	– acyl carrier protein
ATP	– adenosintrifosfát
BBM	– bold basal medium
CoA	– koenzym A
cSH	– centrální thiolová skupina
NADPH	– nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FID	– plynový ionizační detektor
GC	– plynová chromatografie
GPC	– gelová permeační chromatografie
HPLC	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP	– heat shock protein (protein teplotního šoku)
PDA	– detektor diodového pole
IEC	– iontově výměnná chromatografie
LLC	– kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	– kapalinová adsorpční chromatografie
OD	– optická hustota
pSH	– periferní thiolová skupina
UV	– ultrafialové záření
VIS	– viditelná oblast